



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

# **Molecular Identification and Chemical Analyses of Korean Herbal Medicines**

한국 생약재의 식물학적 기원과 화학적 분석 :  
초오, 백부자 및 마황

2019 년 8 월

서울대학교 대학원  
약학과 천연물과학전공  
조경화

# Molecular Identification and Chemical Analyses of Korean Herbal Medicines

한국 생약재의 식물학적 기원과 화학적 분석 :  
초오, 백부자 및 마황

지도교수 서 영 배  
이 논문을 조경화 석사학위논문으로 제출함

2019 년 8 월

서울대학교 대학원  
약학과 천연물과학전공  
조 경 화

조경화의 석사학위논문을 인준함  
2019 년 8 월

위 원 장 김 영 식 (인)

부위원장 이 상 국 (인)

위 원 서 영 배 (인)

## 요 약

# 한국 생약재의 식물학적 기원과 화학적 분석 : 초오, 백부자 및 마황

서울대학교 대학원

약학과

천연물과학 전공

조경화

과거부터 사용되어온 한약(생약)의 기원식물은 대한약전에 정의되고 있는바, 상당수는 동속 근연식물 혹은 다수의 종으로 정의되어 있다. 한편, 한·중 간에 상이한 식물 종이 정의되어 있는 경우도 많다. 특히 생약은 시장에서 절편 형태로 유통되는 경우가 대부분이기 때문에 한약(생약)재의 외형에 의한 기원식물의 확인은 상당한 어려움이 수반된다. 초오는 미나리아재비과에 속하는 *Aconitum kusnezoffii* 이삭바꽃, *A. ciliare* 늦젓가락나물 또는 *A. triphyllum* 세잎돌쩌귀의 덩이뿌리로 정의되고 있으나 국내시장에서는 대부분이 중국의 수입에 의존하고 있다. 백부자는 *A. koreanum* 백부자의 뿌리로 정의되고 있으나 현재 국내 시장에서는 *Helianthus tuberosus* 뚱딴지(돼지감자)가 상당수 유통되고 있는 실정이다. 마황의 기원식물은 *Ephedra sinica*, *E. intermedia* 또는

*E. equisetina*로 정의하고 있으나, 중국에서 전량 수입되고 있다. 그러나 최근 수입 다변화에 의하여 마황은 파키스탄으로부터 수입이 늘어나고 있는 실정이다.

본 연구에서는 초오와 백부자의 현재 국내시장 유통과정 시료를 수집하여 nrRNA ITS 1 의 염기서열을 비교 분석하여 기원식물을 규명하였다. 현재 유통 중인 마황의 기원식물의 확인은 *trnK* 염기서열을 분석으로 이루어졌으며, 원산지에 따른 화학적 변이는 HPLC를 이용하여 그 조성을 비교하였다. 시장에서 수집된 24 개의 초오 시료 중 3 개는 이삭바꽃 또는 세잎돌쩌귀로 판단되었고, 판명 불가능한 3 개 시료를 제외한 나머지 18 개 시료는 *A. karakolicum*으로 판명되었다. 백부자 16 개 시료 중, 3 개는 백부자(식물 종)로 판명되었고, 1 개는 *Aconitum* 속의 식물 종으로, 9 개 시료는 국화과의 *H. tuberosus* 뽕단지로 판명되었다. ITS 1 의 염기서열 분석이 불가능하였던 나머지 시료 3 개는 HPLC를 이용하여, 함유 성분의 화학적 특성을 분석한 결과 *Typhonium giganteum* 독각련이 포함되어 있는 것으로 나타났다. *trnK* 의 염기서열을 분석으로 *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina*는 중국산 마황에서 모두 확인되었고, 파키스탄산 시료는 *E. equisetina*로 판명되었다. HPLC를 이용한 화학성분 분석에서 마황의 기원식물 3 종에서 *E. equisetina* 가 ephedrine 함량이 가장 높았으며, 특히 파키스탄산이 중국산보다 ephedrine의 함량이 약 2~3 배 높은 것으로 나타났다. 이로써 유전자 분석을 통한 기원식물의 규명과 HPLC 방법을 이용한 화학성분의 비교 분석을 병행함으로써 시장에서 유통되는 생약의 품질 및 유통 과정상의

정확한 약제 관리 기준을 정립할 필요성을 초오, 백부자, 마황의 예로써 제시하였다.

**주요어:** 초오, 백부자, 마황, 유전자, 염기서열, HPLC 분석

**학번:** 2017-26795

# 목 차

요 약 .....	i
목 차 .....	iv
<b>List of Figures</b> .....	vi
<b>List of Tables</b> .....	ix
<b>I. 서 론</b> .....	1
<b>II. 초 오</b> .....	2
1. 서 론 .....	2
2. 재 료 .....	3
3. 방 법 .....	4
1) 유전자 분석 .....	4
2) HPLC 비교 분석 .....	7
4. 결 과 .....	14
1) 유전자 분석 .....	14
2) HPLC 비교 분석 .....	19
5. 고 찰 .....	26
<b>III. 백 부 자</b> .....	27
1. 서 론 .....	27
2. 재 료 .....	29

3. 방 법 .....	29
1) 유전자 분석 .....	29
2) HPLC 비교 분석 .....	29
4. 결 과 .....	30
1) 유전자 분석 .....	30
2) HPLC 비교 분석 .....	34
5. 고 찰 .....	37
IV. 마 황 .....	39
1. 서 론 .....	39
2. 재 료 .....	40
3. 방 법 .....	41
1) 유전자 분석 .....	41
2) HPLC 비교 분석 .....	42
4. 결 과 .....	43
1) 유전자 분석 .....	43
2) HPLC 비교 분석 .....	51
5. 고 찰 .....	54
V. 고 찰 .....	56
VI. 참고문헌 .....	57
영문 초록 .....	63



# List of Figures

- Fig. 1. Aligned sequences of nrITS region from 21 samples of Aconiti Kusnezoffii Tuber and additional sequences for comparative purpose. Shaded are the ITS 1 sequences identified from the plant materials of *Aconitum kusnezoffii* (KHB1345644), *A. jaluense* (KHB1176845) and *A. ciliare* (KHB1109515), and the sequence of *A. karakolicum* obtained from GenBank (AY571358). AKT1704 showed two sequences of ITS 1 representing *A. jaluense* and *A. karakolicum*, respectively, which implied the sample could be possibly the mixture of both plant materials .....18
- Fig. 2. Chemical structures of compounds 1-5 of Aconiti Kusnezoffii Tuber .....23
- Fig. 3. Representative HPLC chromatograms of mixed standards and extract of Aconiti Kusnezoffii Tuber samples (A) mixed standards, (B) AKT1703; extract of *Aconitum kusnezoffii*, (C) AKT1710; extract of raw *A. karakolicum*, (D) AKT1709; extract of partially processed *A. karakolicum*, (E) AKT1701; extract of processed *A. karakolicum*...24
- Fig. 4. PCA projection of 21 samples of Aconiti Kusnezoffii Tuber (A) 2015 samples, (B) 2017 samples .....25
- Fig. 5. Aligned sequences of nrITS region from 16 samples of Aconiti Koreani Tuber and additional sequences for comparative purpose. Shaded are the ITS 1 sequences identified from the plant materials of

<i>Aconitum coreanum</i> (KHB1321547), and the sequence of <i>Helianthus tuberosus</i> obtained from GenBank (KX671858). D14 belongs to <i>Aconitum</i> .....	33
Fig. 6. Representative HPLC chromatograms of Aconiti Koreani Tuber on 2015. (A) D2; <i>Aconitum coreanum</i> , (B) D6; <i>Helianthus tuberosus</i> , (C) D1; <i>H. tuberosus</i> .....	35
Fig. 7. Representative UPLC chromatograms of Aconiti Koreani Tuber on 2015. (A) LC-UV (268nm) chromatogram of extract diethylether, (A-1) D1; <i>Helianthus tuberosus</i> , (A-2) D2; <i>Aconitum coreanum</i> , (B) LC-UV (268nm) chromatogram of extract of 70% ethanol, (B-1) standards, (B-2) D1; <i>H. tuberosus</i> , (B-3) D2; <i>A. coreanum</i> , (B-4) D3; <i>Typhonium giganteum</i> .....	36
Fig. 8. Aligned sequences of trnK region from 8 samples of Ephedrae Herba and additional sequences for comparative purpose. The trnK sequences of <i>Ephedra</i> species obtained from GenBank: <i>Ephedra sinica</i> (AB453807), <i>E. intermedia</i> (AB453797) and <i>E. equisetina</i> (AB453795). Shaded are the primers used in this study .....	46
Fig. 9. Aligned proteins of matK region from 3 species of Ephedrae Herba. EH1801; <i>Ephedra intermedia</i> , EH1802; <i>E. sinica</i> , and EH1803; <i>E. equisetina</i> , (A) ORF (open reading frames) 5'3' Frame 3 of EH1801, (B) ORF 5'3' Frame 1 of EH1801 .....	50
Fig. 10. Representative HPLC chromatograms of extract of Ephedrae Herba samples (A) EH1801; <i>Ephedra intermedia</i> , (B) EH1805; processed <i>E.</i>	

<i>sinica</i> , (C-1) E1806; <i>E. equisetina</i> from China, (C-2) 1807; <i>E. equisetina</i> from Pakistan, and the contents of ephedrine of the samples .....	53
--	----

# List of Tables

Table 1. Samples used in this study.....	10
Table 2. The additional plant materials obtained from the herbarium of Korea National Arboretum(KH) and DNA sequence data from GenBank for the comparative analysis of DNA sequences .....	12
Table 3. Information of primers used in this study.....	13
Table 4. Crude drugs used for DNA and HPLC analyses to identify Aconiti Kusnezoffii Tuber collected on the market.....	16
Table 5. Analytical data of regression equation, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for marker compounds in <i>A. karakolicum</i> .....	22
Table 6. Contents of compounds on Aconiti Kusnezoffii Tuber (1-5) .....	22
Table 7. Crude drugs used for DNA and HPLC analyses to identify Aconiti Koreani Tuber collected on the market.....	32
Table 8. Crude drugs used for DNA and HPLC analyses to identify Ephedrae Herba collected on the market and contents of ephedrine .....	45

# I. 서론

각 나라는 의약품 등의 성질과 상태, 품질 및 저장방법 등과 그밖에 필요한 기준에 대한 세부사항을 ‘약전’과 기타 공정서에 고시하고 있다.<sup>1)</sup> 우리나라는 ‘대한민국약전’과 ‘대한민국약전 외 한약(생약) 규격집’ 두 가지 공정서를 사용하고 있으며, 과거부터 사용되어온 한약(생약)의 기원식물은 약전에 정의되고 있는바, 상당수는 동속 근연식물 혹은 다수의 종으로 정의되어 있다.<sup>1,2)</sup> 특히 생약은 일반적으로 절편 형태로 유통되는 경우가 많기 때문에 한약(생약)재의 외형에 의한 기원식물 확인은 상당한 어려움이 있다. 또한, 한·중 간에 상이한 식물 종이 정의되어 있는 경우 수입과 수출 과정에서 혼란이 야기되기도 한다.

초오와 백부자는 *Aconitum* 속으로 독성주의 한약재로 구분된다. 초오는 대부분이 중국의 수입에 의존하고 있고,<sup>3)</sup> 백부자는 국내시장에서 돼지감자가 상당수 유통되고 있는 실정이다. 마황은 기원식물의 서식환경이 건조하고 메마른 사막 지역이며, 그동안 중국에서 전량 수입해왔다.<sup>3)</sup> 그러나 최근 수입 다변화에 의하여 마황은 파키스탄 등지에서 수입되고 있는 실정이다.<sup>4)</sup>

본 연구에서는 현재 국내시장 유통과정 중에 있는 한약(생약)재의 기원식물 규명이 필요한 초오, 백부자, 마황 세 가지 생약에 관하여 유전자 감별법을 이용한 기원식물 확인과 HPLC 비교 분석을 통한 주요 성분의 함량을 분석하였다.

## II. 초 오

### 1. 서 론

전통적으로 초오는 신경통, 관절통, 심장병, 고혈압 및 열성질환 등에 약효가 있는 것으로 알려져 있으며 <sup>5)</sup> 주성분은 diterpenoid alkaloid 계열로 benzoylmesaconine, benzoylaconine, mesaconitine, aconitine, hypaconitine 등이 알려져 있다.<sup>6)</sup> 초오는 우리나라에서 미나리아재비과에 속하는 *Aconitum kusnezoffii* Rchb. 이삭바꽃, *A. ciliare* DC. 늦젓가락나물 또는 *A. triphyllum* Nakai 세잎돌쩌귀의 덩이뿌리로 정의되고 있으나 <sup>2)</sup> 중국에서는 *A. kusnezoffii* 의 덩이줄기만을 초오로 사용하고 있다.<sup>7)</sup> *A. triphyllum* 세잎돌쩌귀는 근연종인 *A. jaluense* Kom. 투구꽃과 형태학적 변이가 중첩되어 나타남으로써 종을 구분 짓는 한계가 애매하여, 분류학적 처리에 다양한 견해가 제시되어 왔으며 <sup>8-10)</sup> 이는 중간 교배로 인한 잡종화에 기인한 것으로 추정되었고,<sup>11)</sup> flavonoid 분석에 의하여 확인된 바 있다.<sup>12)</sup> 이로 인하여 최근에는 *A. triphyllum* 세잎돌쩌귀는 더 이상 독립된 종으로 인식되지 못하고 *A. jaluense* 투구꽃의 일종으로 간주되고 있다. *A. triphyllum* 세잎돌쩌귀가 비록 우리나라의 공정서에서는 초오의 기원식물의 하나로 정의되고 있으나, 본 논문에서는 최근 제시되고 있는 분류학적 처리에 따라 *A. jaluense* 투구꽃의 일종으로 판단하였다.

국내의 경우, 상당량의 생약을 중국으로부터의 수입에 의존하고 있기 때문에, 유통되고 있는 생약은 중국 시장의 영향을 받지 않을 수 없다. 초오의 경우 중국에서는 *A. kusnezoffii* 이삭바꽃이 유일하게 기원식물로

정의되고 있고, 우리나라 공정서에도 이 식물종이 초오의 기원식물의 하나로 정의되기 때문에, 중국 약전 기준에 부합되는 초오가 중국으로부터 수입되어 국내에서 유통되는 것은 국내의 품질 기준에도 적합하다. 그러나, 최근 중국에서 신장 지방에 분포하는 *A. karakolicum* Rapais 가 초오로 사용되는 사례가 보고되어<sup>13)</sup> 초오의 상당량을 중국으로부터의 수입에 의존하는 우리나라의 실정에 비추어 *A. karakolicum* 이 국내에서도 초오로 무분별하게 혼용되어 유통될 가능성을 배제할 수 없게 되었다. 한편으로 *A. karakolicum* 은 aconitine, hypaconitine, mesaconitine 등의 diterpene alkaloid 계 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며<sup>14)</sup> aconitene 류의 alkaloid 계 성분은 혈압하강, 사지궤냉, 삼실세동 등의 부작용을 일으킬 수 있다고 보고되어 있으므로,<sup>15)</sup> 초오의 유통 과정은 엄밀한 감시가 필요하다. 이에 본 연구는 유전자 염기서열 분석을 통해 국내에서 유통되고 있는 초오의 기원식물을 판별하고, HPLC 분석법을 이용하여 diterpenoid alkaloid 주성분을 정량하고자 한다.

## 2. 재 료

국내에서 유통되고 있는 초오 24 종을 2015 년과 2017 년 두 차례에 걸쳐 생약재 시장에서 수집하여 DNA 분석을 실시하였다(Table 1). 초오의 기원식물로 공정서에 기재되어 있는 *A. kusnezoffii* 이삭바꽃, *A. jaluense*(= *A. triphyllum*) 투구꽃, *A. ciliare* 늦젓가락나물의 DNA 분석은 국내에서 직접 채집되어 동정이 확정된 후, 국립수목원 식물표본관(KH)에 소장되어 있는 식물표본에서 채취한 소량의 잎으로 이루어졌다(Table 2). 중국

신장 지방의 고산(고도 1800-2000 m)에 서식하는 것으로 알려진 *A. karakolicum* 의 ITS 염기서열은 GenBank 데이터베이스를 검색하여 확인하였다(Table 2). DNA 분석에 사용된 초오 시료의 증거표본은 서울대학교 약학대학 자원식물표본관(NPRI)에 소장되어 있다(Table 1).

### 3. 방 법

#### 1) 유전자 분석

**DNA 의 추출** - 초오 시료를 가로세로 2-5 mm 정도 크기로 절편 하여 막자사발에서 석영 모래와 함께 분말 상태로 마쇄한 후 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA 를 추출하였다. 마쇄한 미세 분말을 약 20 mg 취해 1.5 ml 의 microcentrifuge tube 에 각각 담고 400 µl 의 AP1 완충용액과 100 mg/ml 농도의 RNase A 용액 4 µl 를 첨가한 뒤 65°C heat block 에서 3 시간 방치하였으며, 15 분에 한 번씩 흔들여 시료 분말과 완충용액을 섞어주는 과정을 반복하였다. 3 시간 경과 후 130 µl 의 P3 완충용액을 첨가하여 섞은 뒤 얼음에서 15 분간 방치한 후, 탁상용 원심 분리기로 13,500 rpm 에서 2 분간 원심분리하여 상층액 500 µl 를 취하여 2 ml collection tube 에 장착시킨 QIA shredder Mini spin column 에 옮긴 뒤 13,500 rpm 으로 2 분간 원심분리하였다. QIA shredder Mini spin column 을 통과한 400 µl 추출액을 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube 에 옮긴 후 AW1 완충용액 600 µl 를 첨가하여 섞은 뒤 2 분간 원심분리하였다. 일차로 혼합용액 600 µl 를 2 ml collection tube 가 장착된 DNeasy Mini spin column 에 안착시키고, 2 분간 원심분리하여 통과액을 폐기하였다. 나머지 혼합용액



400  $\mu$ l 를 동일한 DNeasy Mini spin column 에 다시 안착시키고, 2 분간 원심 분리하여 추출된 DNA 가 DNeasy Mini spin column membrane 에 결집되도록 하였다. DNeasy Mini spin column 을 2 ml collection tube 에 장착시키고 500  $\mu$ l 의 AW2 완충용액을 가하여 2 분간 원심분리하여 일차 세척하였다. 일차 세척이 끝난 DNA 를 동일방법으로 이차 세척하였다. 세척과정에서 잔존하는 알코올 성분을 완전히 제거하기 위하여 세척된 DNeasy Mini spin column 을 추가적으로 2 ml collection tube 에 장착시켜 3 분간 원심분리 한 후 1.5 ml microcentrifuge tube 에 옮긴 후 뚜껑을 열고 20 분간 실온에서 건조했다. 건조된 DNeasy Mini spin column 에 65°C 의 AE 완충용액 100  $\mu$ l 를 가하고 5 분간 실온에서 DNA 를 membrane 으로부터 용출시킨 후, 2 분간 원심분리하여 통과액을 수집하였다. 이차로 50  $\mu$ l 의 AE 완충용액을 DNeasy Mini spin column 에 추가하여 5 분간 실온에서 DNA 를 membrane 으로부터 재차 용출시킨 후, 2 분간 원심분리로 통과액을 수집 하였다. 추출된 DNA 는 농도 0.75  $\mu$ g  $\lambda$  DNA-Hind III digest (Takara Bio Inc., Japan)와 함께 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide 를 포함하는 0.7% agarose gel 에서 100 V 로 45 분간 전기영동 한 후, UV 조명 하에서 밝기를 상호 비교하여 확인하였다.

**PCR 증폭 및 정제 (PCR 기법을 이용한 ITS 유전자 증폭)** - 관속식물을 종 수준에서 판별하는데 유용한 것으로 확인된 nrDNA 의 ITS 구간의 염기서열의 비교 분석을 위하여 PCR 기법을 이용하여 5.8S 를 포함하는 ITS 1 및 ITS 2 의 전체 구간을 증폭하고, 특히 이 중에서 초오속 식물 종 사이에서 뚜렷이 차이를 나타내는 ITS 1 구간의 염기서열을 비교 분석 하였다. PCR 증폭은 Takara Ex Taq(Takara Bio Inc., Japan)를 사용하여

수행하였는데, 50 µl 반응액은 10 x Ex Taq 완충용액 5 µl, dNTP 4 µl, MgCl<sub>2</sub> 3 µl, Takara Ex Taq 0.2 µl, DDW 31.8 µl, 각 primer 2 µl 와 추출 DNA 2 µl 를 포함하도록 하였다. PCR 은 일차적으로 ITS 5(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')와 ITS 4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 primer 로 사용하여 ITS 1 과 5.8S, 그리고 ITS 2 를 포함하는 전체 ITS 구간을 증폭한 후에, ITS 1 구간만을 증폭하고자 primer ITS 1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS 2(5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3')을 사용하여 PCR 을 재차 수행하였다(Table 3).<sup>16)</sup> 일차 PCR 은 94°C 에서 5 분간 전처리, 그리고 94°C 30 초, 55°C 30 초, 72°C 1 분의 과정을 40 회 반복한 후, 72°C 에서 7 분간 최종 처리하였으며, 이차 PCR 은 95°C 에서 5 분간 전처리, 그리고 94°C 30 초, 52°C 30 초, 72°C 1 분의 과정을 35 회 반복, 그리고 72°C 에서 7 분간 최종 처리로 이어지는 과정으로 진행하였다. PCR 산물은 반응 완료 후, 0.7% agarose gel 에서 50 V 로 50 분간 전기영동 하여 증폭을 확인한 후, High Pure PCR Product Purification Kit(Roche, Germany)를 사용하여 정제하였다. 이후 염기서열 분석 실험 시까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다.

**염기서열 결정 및 비교 분석** - 정제된 PCR 산물의 염기 서열은 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems, CA)를 사용하여 PTC-225 Peltier Thermal Cycler(MJ Research Inc., MA)로 thermal cycle sequencing 반응을 수행한 후에, ABI PRISM 3730XL Analyzer(Applied Biosystems, CA)로 염기서열을 분석하였다. ITS 구간의 염기서열 결정은 PCR primer 를 sequencing primer 로 사용하였다. 분석된 염기서열은 Sequencher version 4.5(Gene Codes Inc., MI)를 이용하여 재확인하였다.

염기서열의 차이를 상호 비교하기 위한 분석은 Clustal X 1.64b (Thompson et al., 1997)을 이용하여 <sup>17)</sup> 염기서열을 정렬한 후, 재차 육안으로 확인하고 보정하여 염기서열의 차이를 비교 분석하였다. 확인된 염기서열은 GenBank 데이터베이스의 BLAST 검색 옵션을 사용하여 염기서열의 동일성을 비교 검색하였다.

## 2) HPLC 비교 분석

분석에 사용된 HPLC 용 acetonitrile 은 J.T. Baker(Philipsburg, NJ, USA)에서 구입하였고 3 차 증류수는 NANO pure Diamond(Barnstead Int., Dubuque, IA, USA)을 이용하여 사용하였다. HPLC 분석을 위한 기기로는 Hitachi L-6200 HPLC pump(Hitachi Chemical, Tokyo, Japan), Sedex 75 증기화광산란 Evaporative Light Scattering Detector(ELSD, Sedere, Virty-sur-Seine, France), SIL-9A auto injector(Shimadzu, Japan)을 이용하였다. 분석용 칼럼은 Sinco C<sub>18</sub> column(4.6×250 mm, 5 µm, Sinco Co, Seoul, Korea)을 사용하였다.<sup>18)</sup> 시료 1.0 g 에 diethyl ether 와 ammonia 를 6:1 의 비율로 총 혼합물 5 ml 를 추출용매로 사용하여 30 분간 초음파를 이용하여 성분 추출하였다. 0.45 polytetrafluoroethylene(PTFE) membrane 필터를 이용하여 여과하였다. 여과액을 aceto-nitrile 과 1:1 로 희석한 후 농축하여 HPLC 분석용 시료로 하였다.

**HPLC 표준액 및 검체의 조제** - benzoylmesaconine(1), benzoylaconine(2), mesaconitine(3), aconitine(4), hyphaconitine (5) 5 종의 분석용 표준품(순도 99.0%)을 Avention Chemical (Incheon, Korea)에서 구입하여 각각 MeOH 에 1 mg/ml 농도로 녹인 후 냉장 보관한 후 분석 전에 희석하여 사용하였다.

**분석조건** - HPLC 이동상으로 A(0.05% triethylamine 이 첨가된 distilled water)와 B(0.05% triethylamine 이 첨가된 acetonitrile)의 혼합액을 이용하였다. 초오 24 개의 함량분석을 위한 HPLC 구배 조건은 0-3 분(20-30% B), 3-10 분(30% B), 10-20 분(30-50% B), 20-30 분(50-55% B), 30-40 분(55-75% B), 40-45 분(75- 100% B)이다. 유속은 1.0 ml/min 으로 하였다. 주입 용량은 20  $\mu$ l 로 설정하였다.<sup>19)</sup>

**분석법의 검증** - 분석법에 대한 검증으로 국제 의약품 규제조화 위원회 International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) 가이드라인에 따라 직선성, 검출한계와 정량한계를 측정하여 분석법의 타당성을 검증하였다.

**직선성** - benzoylemesaconine(1), benzoyleaconine(2), mesaconitine(3), aconitine(4), hyaconitine(5)을 MeOH 에 1 mg/ ml 농도로 녹인 후 31.25, 62.5, 125, 250, 500  $\mu$ g/ml 로 총 5 개의 구간을 설정하여 3 회 반복 측정 후 작성된 검량선의 상관계수( $R^2$ )로 직선성을 평가하였다.

**검출한계와 정량한계** - ICH 가이드라인에 따라 신호 대 잡음비가 각각 3:1 과 10:1 일 때의 농도로 계산하였다. 검출 한계 Limit of Detection (LOD)= $3 \times (\delta/S)$ , 정량한계 Limit of Quantitation (LOQ)= $10 \times (\delta/S)$  계산식을 이용하여 계산하였다.  $\delta$  는 검량선의 직선 방정식 y 축 값의 표준편차이며 S 는 검량선의 직선 방정식의 기울기 값이다. 검출한계는 분석 시 기기에서 검출될 수 있는 지표물질의 최소값을 나타내고, 정량한계는 검출한계의 3 배 값으로 기기에서 정량 할 수 있는 최소값을 의미한다.

**함량분석** - benzoylemesaconine(1), benzoyleaconine(2), mesaconitine(3), aconitine(4), hypaconitine(5)의 함량은 선형회귀 방정식을 이용하여 계산하였다.

**PCA 분석** - 초오 시료의 DNA 분석과 HPLC 함량 분석에 대한 차이를 확인하기 위해 HPLC 함량분석 지표물질을 변수로 하여 Principal Component Analysis(PCA)를 적용하여 패턴분석을 실시하였다. 주성분 분석에는 IBM SPSS Statistics 23(IBM Company, New York, USA) 프로그램을 사용하였다.

**Table 1.** Samples used in this study

Sample No.	Crude drug	Collection	
		Location	Date
AKT1501	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.04.30
AKT1502	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Local market; Korea	2015.04.30
AKT1503	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.04.30
AKT1504	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Local market; China, Henan	2015.05.28
AKT1505	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Local market; Korea	2015.07.10
AKT1506	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.07.10
AKT1507	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.07.10
AKT1508	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.03.19
AKT1509	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.04.25
AKT1510	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.04.25
AKT1511	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Local market; China, Hebei	2015.06.26
AKT1512	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.06.26
AKT1513	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.06.26
AKT1514	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2015.05.28
AKT1701	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Local market; Korea, Gangwon Prov: Yeongwol	2017.09.05
AKT1702	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Local market; Korea, Chungbuk Prov: Goesan	2017.09.05
AKT1703	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Mungyeong	2017.09.04
AKT1704	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Gyeongju	2017.09.05
AKT1705	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China, Liaoning	2017.09.05
AKT1706	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China	2017.09.04
AKT1707	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China, Jiangsu	2017.09.05
AKT1708	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China, Yunan	2017.09.05
AKT1709	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China, Sichuan	2017.09.05
AKT1710	Aconiti Kusnezoffii Tuber	Imported; China, Sichuan	2017.09.04
D1	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea	2015.04.30
D2	Aconiti Koreani Tuber	Imported; China	2015.04.30

**Table 1.** Continued

Sample No.	Crude drug	Collection	
		Location	Date
D3	Aconiti Koreani Tuber	Local market; China, Henan	2015.05.28
D4	Aconiti Koreani Tuber	Local market; China, Jiangxi	2015.05.28
D5	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong	2015.07.10
D6	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong	2015.07.10
D7	Aconiti Koreani Tuber	Imported; China	2015.07.10
D8	Aconiti Koreani Tuber	Imported; China	2015.03.19
D9	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea, Chonnam Prov: Hwasun	2015.04.24
D10	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong	2015.04.24
D11	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Bonghwa	2015.04.24
D12	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong	2015.07.31
D13	Aconiti Koreani Tuber	Imported; China	2019.04.12
D14	Aconiti Koreani Tuber	Imported; China	2019.04.12
D15	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea	2019.04.12
D16	Aconiti Koreani Tuber	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong	2019.04.12
EH1801	Ephedrae Herba	Imported; China	2018.05.01
EH1802	Ephedrae Herba	Imported; China	2018.05.01
EH1803	Ephedrae Herba	Imported; China	2018.05.01
EH1804	Ephedrae Herba	Imported; China	2018.05.01
EH1805	Ephedrae Herba	Imported; China	2018.05.01
EH1806	Ephedrae Herba	Imported; China	2018.08.30
EH1807	Ephedrae Herba	Imported; Pakistan	2018.08.30
EH1808	Ephedrae Herba	Imported; Pakistan	2018.08.30

**Table 2.** The additional plant materials obtained from the herbarium of Korea National Arboretum(KH) and DNA sequence data from GenBank for the comparative analysis of DNA sequences

Specimen / Accession No.	Species	Ref.
KHB1345644(KH)	<i>A. kusnezoffii</i>	<b>Korea:</b> Chungcheongbuk-do: Danyang-gun: Gagok-myeon: Eougok-ri. 2 Sept 2011. B. W. Oh et al.
KHB1176845(KH)	<i>A. jaluense</i>	<b>Korea:</b> Gangwon-do: Samcheok-si: Hajang-myeon: Duta Mt. 8 Sept 2007. J. O. Hyun et al.
KHB1109515(KH)	<i>A. ciliare</i>	<b>Korea:</b> Gangwon-do: Jeongseon-gun: Gohan-eup: Geumdaebong-gil. 14 Aug 2005. U. S. Jeon et al.
AY571358(GenBank)	<i>A. karakolicum</i>	Luo, Y., Zhang, F., Ge, S. and Yang, Q.-E. Phylogeny of Aconitum subgenus Aconitum (Ranunculaceae) inferred from ITS sequence. Unpublished.
KHB1321547(KH)	<i>A. coreanum</i>	<b>Korea:</b> KH. 27 Oct 2015
KX671858(GenBank)	<i>Helianthus tuberosus</i>	Schilling,E.E. and Floden,A.Barcoding the Asteraceae of Tennessee, tribes Heliantheae and Millerieae. Unpublished (USA) 2016
AB453807(GenBank)	<i>Ephedra sinica</i>	Kitani,Y., Zhu,S., Omote,T., Tanaka,K., Batkhuu,J., Sanchir,C., Fushimi,H., Mikage,M. and Komatsu,K. Molecular analysis and chemical evaluation of ephedra plants in Mongolia. (2009) <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 32, 1235-1243
AB453797(GenBank)	<i>E. intermedia</i>	"
AB453795(GenBank)	<i>E. equisetina</i>	"



**Table 3.** Information of primers used in this study

<b>Primers</b>	<b>Primer sequence 5'-3'</b>	<b>Reference</b>
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White <i>et al.</i> 1990
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	White <i>et al.</i> 1990
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	White <i>et al.</i> 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> 1990
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	White <i>et al.</i> 1990
trnK 3914F	GGG GTT GCT AAC TCA ACG G	Kitani Y. et al. 2009
trnK In 2F	AAT TTT CAA TCA GTC TTT TCT CTA	Kitani Y. et al. 2009
trnK In 3F	ATT GAT TTT GCT GGG AAC TAC TAT	Kitani Y. et al. 2009
trnK In 3R	CTT TAG CAA TCT TAT CGT GTC TTT	Kitani Y. et al. 2009
trnK In 2R	ACG TTT ATT TAT TGC TTC ACT GTA	Kitani Y. et al. 2009
trnK 2R	AAC TAG TCG GAT GGA GTA G	Kitani Y. et al. 2009

## 4. 결 과

### 1) 유전자 분석

2015 년과 2017 년 두 차례에 걸쳐 국내 시장에서 24 개의 초오를 수집하여 분석한 결과, 시료 AKT1504, AKT1511, AKT1514 를 제외한 21 개의 시료에서 ITS 1 의 염기서열을 결정할 수 있었다(Table 4). DNA 분석이 불가능하였던 세 개의 시료는 포제 및 약재의 처리 과정 중에 DNA 가 손상되었기 때문인 것으로 추정된다. 한편으로 초오의 기원식물로 정의된 *A. kusnezoffii* 이삭바꽃, *A. jaluense*(= *A. triphyllum*) 투구꽃, *A. ciliare* 늦젓가락나물의 ITS 1 은 국립수목원 표본관에 수집되어 있는 식물 건조표본 시료를 분석하여 확인하였다(Table 2). 또한 중국 신장 고산지역에 서식하는 것으로 알려진 *A. karakolicum* 의 ITS 1 염기서열은 GenBank 데이터베이스에서 획득하였다 (Table 2). 염기서열의 비교 분석 결과, *A. kusnezoffii* 이삭바꽃과 *A. jaluense* 투구꽃은 동일한 ITS 1 의 염기서열을 가지는 것으로 나타났고, *A. ciliare* 늦젓가락나물은 이 두 종과 252 bp 크기의 ITS 1 에서 3 개 염기의 차이가 있었으며, 1 개 염기의 소실이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1). 한편으로 *A. karakolicum* 은 이들 세 종과 ITS 1 에서 현저한 차이를 나타내어, 공정서에 제시되어 있는 초오의 기원식물들과 뚜렷이 구별되었다(Fig. 1).

ITS 1 구간의 DNA 분석 결과, 국내산으로 표기된 6 개의 시료 중 AKT1502, AKT1505, AKT1703 세 개의 시료가 *A. kusnezoffii* 이삭바꽃 혹은 *A. jaluense* 투구꽃으로 확인되었으며(Fig. 1), 국내 공정서에서 정의되는 초오의 기준에 적합한 것으로 나타났다. 그러나 이를 제외한 나머지 국내산 표기 시료 AKT1701 과 AKT1702 는 중국 식물 종인 *A. karakolicum* 으로 확인되었다(Fig. 1). 특히, 국내산 표기 시료 중의 하나인 AKT1704 의 시료를 반복적으로 ITS 1

염기서열을 분석한 결과, *A. jaluense* 의 염기서열(AKT1704- 1, AKT1704-2)과 *A. karakolicum* 의 염기서열(AKT1704-3, AKT1704-4) 두 종류가 나타났다(Fig. 1). 이는 AKT1704 의 포장에 국내산으로 표기되어 있었으나, *A. jaluense* 와 중국 식물인 *A. karakolicum* 의 괴경이 혼재되어 있는 것으로 판명되었다. 따라서, 시중에 유통되고 있는 초오의 정확한 원산지 표기 과정은 엄격한 확인 절차가 필요할 것으로 사료된다.

또한 중국 원산지로 표시된 총 18 개 시료 중 AKT1504, AKT1511, AKT1514 는 DNA 염기서열 확인이 불가능하였고, 나머지 15 개 시료는 *A. karakolicum* 으로 확인되었다(Fig. 1, Table 4). Luo (2016)도 중국에서 유통되고 있는 초오를 대상으로 ITS 염기서열을 분석한 결과 *A. kusnezoffii* 이외에, *A. karakolicum* 이 사용되고 있는 것을 확인한 바 있다.<sup>13)</sup> 이는 이미 중국에서도 *A. karakolicum* 이 초오로 오용되고 있으며, 중국으로부터 상당량의 초오를 수입하는 우리나라의 시장에도 *A. karakolicum* 이 무분별하게 수입되어 유통되고 있는 것으로 판단된다. 따라서, 국내 시장에서 초오의 유통과정의 혼란을 방지하기 위하여 기원 식물종을 정확히 동정함으로 공정서 기준에 부합되는 품질 기준의 엄격한 적용이 필요하다.

초오에는 aconitine 성분을 비롯하여 mesaconitine, hypaconitine 이 함유되어 있기 때문에 급성중독의 부작용을 일으켜 독성주의 한약재로 구분되고 있다. 중국 약전에서는 초오를 적정 용량 포제하여 사용할 것을 권장하고 있으며, 포제가 제대로 이루어지지 않을 경우 중독 증상이 발생할 수 있다고 경고하고 있다.<sup>7)</sup> 본 연구결과로 기원식물의 확인이 제대로 이루어지지 않은 상황을 고려해볼 때, 안정성을 위한 포제 처리와 기준 함량 준수 확인이 필요하다.

Table 4. Crude drugs used for DNA and HPLC analyses to identify *Aconiti Kusnezoffii* Tuber collected on the market

Sample No.	Source labeled on merchandise	Species identified by DNA analysis	Species identified by HPLC analysis
AKT1501	Imported; China, 30 Apr 2015	<i>Aconitum karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1502	Local market; Korea, 30 Apr 2015	<i>A. kusnezoffii</i> / <i>A. jaluense</i>	<i>A. kusnezoffii</i>
AKT1503	Imported; China, 30 Apr 2015	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1504	Local market; China, Henan, 28 May 2015	N.D.	<i>A. kusnezoffii</i>
AKT1505	Local market; Korea, 10 Jul 2015	<i>A. kusnezoffii</i> / <i>A. jaluense</i>	<i>A. kusnezoffii</i>
AKT1506	Imported; China, 10 Jul 2015	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1507	Imported; China, 10 Jul 2015	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1508	Imported; China, 19 Mar 2015	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1509	Imported; China, 25 Apr 2015	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1510	Imported; China, 25 Apr 2015	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1511	Local market; China, Hebei, 28 May 2015	N.D.	<i>A. karakolicum</i>
AKT1512	Imported; China, 26 Jun 2015	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1513	Imported; China, 26 Jun 2015	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1514	Imported; China, 26 Jun 2015	N.D.	<i>A. karakolicum</i>
AKT1701	Local market; Korea, Gangwon Prov: Yeongwol, 5 Sept 2017	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1702	Local market; Korea, Chungbuk Prov: Goesan, 5 Sept 2017	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1703	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Mungyeong, 4 Sept 2017	<i>A. kusnezoffii</i> / <i>A. jaluense</i>	<i>A. kusnezoffii</i>
AKT1704*	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Gyeongju, 5 Sept 2017	<i>A. jaluense</i> + <i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1705	Imported; China, Liaoning, 5 Sept 2017	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1706	Imported; China, 4 Sept 2017	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1707	Imported; China, Jiangsu, 5 Sept 2017	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>

**Table 4.** Continued

Sample No.	Source labeled on merchandise	Species identified by DNA analysis	Species identified by HPLC analysis
AKT1708	Imported; China, Yunan, 5 Sept 2017	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1709	Imported; China, Sichuan, 5 Sept 2017	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>
AKT1710	Imported; China, Sichuan, 4 Sept 2017	<i>A. karakolicum</i>	<i>A. karakolicum</i>

\* AKT1704 showed two ITS 1 sequences for both *A. jaluense* and *A. karakolicum*, which implied the sample could be possibly mixed (see Fig. 1).

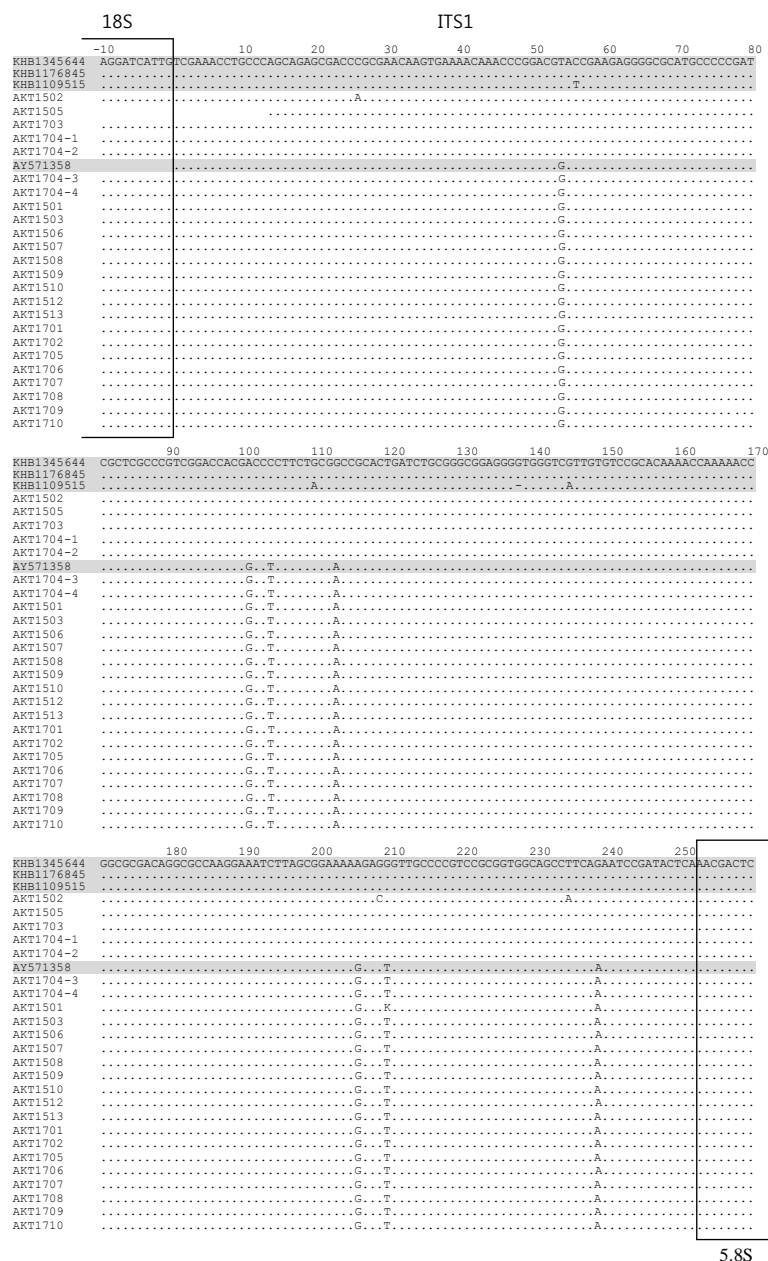


Fig. 1. Aligned sequences of nrITS region from 21 samples of *Aconiti Kusnezoffii* Tuber and additional sequences for comparative purpose. Shaded are the ITS 1 sequences indentified from the plant materials of *Aconitum kusnezoffii* (KHB1345644), *A. jaluense* (KHB1176845) and *A. ciliare* (KHB1109515), and the sequence of *A. karakolicum* obtained from GenBank (AY571358). AKT1704 showed two sequences of ITS 1 representing *A. jaluense* and *A. karakolicum*, respectively, which implied the sample could be possibly the mixture of both plant materials.

## 2) HPLC 비교 분석

**HPLC 분석조건의 확립** - 초오의 지표성분으로 알려진 benzoylmesaconine(1), benzoylaconine(2), mesaconitine(3), aconitine(4), hypaconitine(5)의 최적 분석법을 확립하였다(Fig. 2, 3-A). 정량분석하기 위해 HPLC C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 칼럼을 이용하여 이동상 용매 0.05% trimethylamine 이 함유된 물과 acetonitrile 기울기 용매 조건으로, 유속은 1 ml/min 로 고정하였다. 이를 통해 모든 표준액은 간섭 없이 명확하게 분리할 수 있었다.

**직선성** - 지표성분 화합물 1, 2, 3, 4, 5 의 표준용액을 31.25, 62.5, 125, 250, 500 μg/ml 의 5 가지 농도로 검량선을 작성하였다. 그 결과, 상관계수(R<sup>2</sup>)가 benzoylmesaconine(1)은 0.9889, benzoylaconine(2)는 0.9993, mesaconitine(3)은 0.9880, aconitine(4)는 0.9771, hypaconitine(5)는 0.9912 를 나타내어 높은 직선성을 확인하였다. 이에 대한 직선 방정식은 benzoylmesaconine(1)은  $y=7.9612x+138.81$ , benzoylaconine(2)는  $y=9.3847x-152.89$ , mesaconitine(3)은  $y=23.794x-847.54$ , aconitine(4)는  $y=28.253x-1107.9$ , hypaconitine(5)는  $y=20.291x-844.45$  의 식을 나타내었다(Table 5).

**검출한계와 정량한계** - 검량선의 직선 방정식의 y 절편 값의 표준편차와 직선 방정식의 기울기를 이용하여 ICH 가이드라인에 따라 계산한 결과, benzoylmesaconine(1)의 검출 한계는 0.13 μg/ml, 정량한계는 0.39 μg/ml 를 나타내었으며 benzoylaconine(2)의 검출한계는 0.13 μg/ml, 정량한계는 0.39 μg/ml, mesaconitine(3)의 검출한계는 0.17 μg/ml, 정량한계는 0.51 μg/ml, aconitine(4)의 검출한계는 0.11 μg/ml, 정량한계는 0.33 μg/ml, hypaconitine(5)의 검출한계는 0.14 μg/ml, 정량한계는 0.42 μg/ml 로 측정되어 미량의 성분도 정량분석이 가능함을 확인하였다(Table 5).

**주요성분의 함량분석** - HPLC 를 이용하여 24 개의 초오 중 주요 성분의 함량분석을 위해 지표성분으로 선정한 5 종의 표준액을 분석하였다. Benzoylmesaconine(1)은 15 분에, benzoylaconine(2)는 24 분, mesaconitine(3)은 27 분, aconitine(4)는 33 분, hypaconitine(5)는 43 분에서 확인을 하였으며, 상호 피크 간의 간섭 없이 분리된 단일 피크로 검출되었다(Fig. 3). AKT1504, AKT1511, AKT1514 를 제외하고 시료 21 개의 HPLC 함량분석으로 추측되는 초오의 기원 결과와 DNA 분석 결과가 일치하였다(Table 4). DNA 분석이 불가하였던 AKT1504, AKT1511, AKT1514 는 크로마토그래피 양상으로 기원식물을 판단하였다.

AKT1502, AKT1505, AKT1703 은 *A. kusnezoffii* 로 HPLC 함량분석에서 mesaconitine(3)의 함량이 높은 것으로 확인하였다. AKT1504 와 AKT1704 가 이와 유사한 크로마토그래피 양상을 보였으며, AKT1504 는 동일한 식물 종으로 판단하였고, AKT1704 는 DNA 분석 결과에서 *A. kusnezoffii* 와 *A. karakolicum* 이 혼재되어있는 것으로 판단되었지만 HPLC 분석에서는 *A. karakolicum* 특성에 더 가까운 것으로 확인되었다(Fig. 3, Table 4).

또한 HPLC 함량분석으로 포제의 정도에 따른 *A. karakolicum* 의 성분 변화가 관찰되었다. AKT1506, AKT1508, AKT1509, AKT1510, AKT1513, AKT1706, AKT1707, AKT1710 과 같이 aconitine(4)이 많이 검출된 초오는 포제를 하지 않은 *A. karakolicum* 으로 여겨진다. AKT1501, AKT1503, AKT1507, AKT1512, AKT1705, AKT1708, AKT1709 에서 알 수 있듯이 포제가 많이 될수록 aconitine(4)의 함량은 줄고, benzoylaconine(2)이 늘었음이 확인되었다. AKT1511, AKT1701, AKT1702 는 더 많이 포제가 되어 benzoylmesaconine(1)의 함량이 확연히 증가하였다(Fig. 3, Table 4).



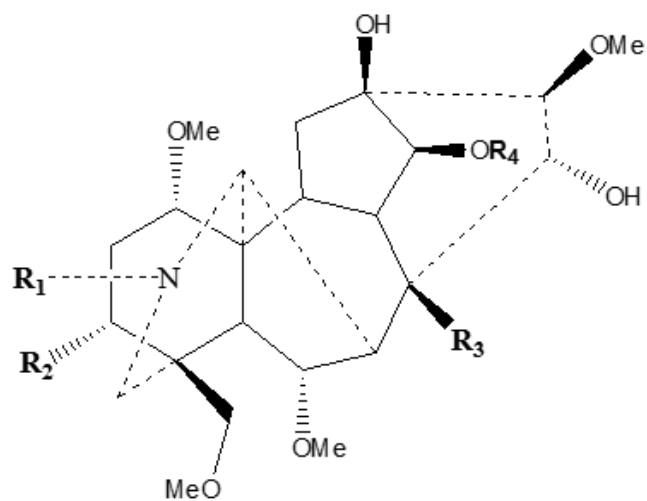
**PCA 분석** – 초오 시료의 DNA 분석과 HPLC 함량 분석에 군집 형성 차이를 확인하였다. 서로 기원이 다른 초오 *A. karakolicum* 과 *A. kusnezoffii* 이 구별되어 군집을 형성하였다(Fig. 4).

**Table 5.** Analytical data of the regression equation, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for marker compounds in *A. karakolicum*

No.	Compounds	t <sub>R</sub> (min)	Linear regression equation	R <sup>2</sup>	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
1	Benzoylmesaconine	15	y=7.9612x +138.81	0.99	0.13	0.39
2	Benzoylaconine	24	y=9.3847x -152.89	0.99	0.13	0.39
3	Mesaconitine	27	y=23.79x -847.54	0.99	0.17	0.51
4	Aconitine	33	y=28.253x -1107.9	0.98	0.11	0.33
5	Hypaconitine	43	y=20.291x -844.45	0.99	0.14	0.42

**Table 6.** Contents of compounds on Aconiti Kusnezoffii Tuber (1-5)

Sample No.	Contents of compounds (µg/ml)				
	Benzoyl- mesaconine	Benzoyl- aconine	Mesaconitine	Aconitine	Hypaconitine
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
AKT1501	69.78	1068.87	165.15	2395.53	61.01
AKT1502	146.14	68.04	105.38	188.99	74.69
AKT1503	69.78	302.12	138.34	1077.68	59.29
AKT1504	148.94	145.61	110.08	156.32	77.17
AKT1505	138.35	73.08	69.57	109.89	59.75
AKT1506	70.67	64.73	58.39	1259.81	67.19
AKT1507	70.06	682.53	103.68	1288.55	59.38
AKT1508	69.78	72.81	82.55	18874.63	82.60
AKT1509	75.62	66.12	63.05	5191.82	60.54
AKT1510	70.38	85.00	61.01	400.66	58.69
AKT1511	849.21	66.67	58.75	70.65	71.20
AKT1512	72.54	65.02	59.56	1780.80	60.55
AKT1513	70.18	1276.10	151.14	1433.65	61.16
AKT1514	437.84	303.40	603.25	75.50	59.96
AKT1701	1032.19	397.57	308.19	313.20	330.83
AKT1702	474.57	503.84	308.85	366.43	320.04
AKT1703	1155.69	488.13	1721.12	351.62	323.33
AKT1704	298.80	351.66	311.25	332.86	319.92
AKT1705	737.26	1464.07	1059.19	341.16	321.74
AKT1706	296.35	305.85	482.03	952.18	380.37
AKT1707	502.50	1187.04	307.80	415.05	319.73
AKT1708	554.94	1866.81	697.92	354.84	333.01
AKT1709	514.76	2196.44	1442.57	336.95	320.73
AKT1710	981.49	763.03	692.60	384.99	327.57



No.	Compounds	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	Benzoylmesaconine	Ethyl	-OH	-OH	-COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
2	Benzoylaconine	Ethyl	-OH	-OH	-COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
3	Mesaconitine	Methyl	-OH	-OCOCH <sub>3</sub>	-COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
4	Aconitine	Ethyl	-OH	-OCOCH <sub>3</sub>	-COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
5	Hypaconitine	Methyl	-H	-OCOCH <sub>3</sub>	-COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>

Fig. 2. Chemical structures of compounds 1-5 of Aconiti Kusnezoffii Tuber

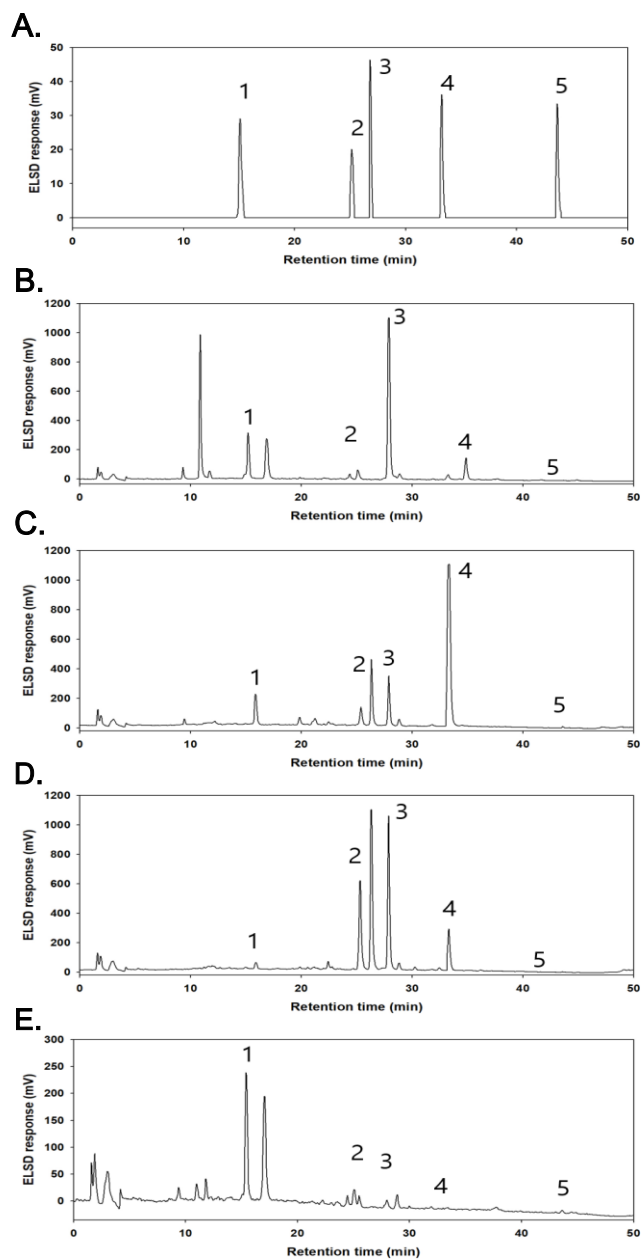


Fig. 3. Representative HPLC chromatograms of mixed standards and extract of *Aconiti Kusnezoffii* Tuber samples (A) mixed standards, (B) AKT1703; extract of *Aconitum kusnezoffii*, (C) AKT1710; extract of raw *A. karakolicum*, (D) AKT1709; extract of partially processed *A. karakolicum*, (E) AKT1701; extract of processed *A. karakolicum*

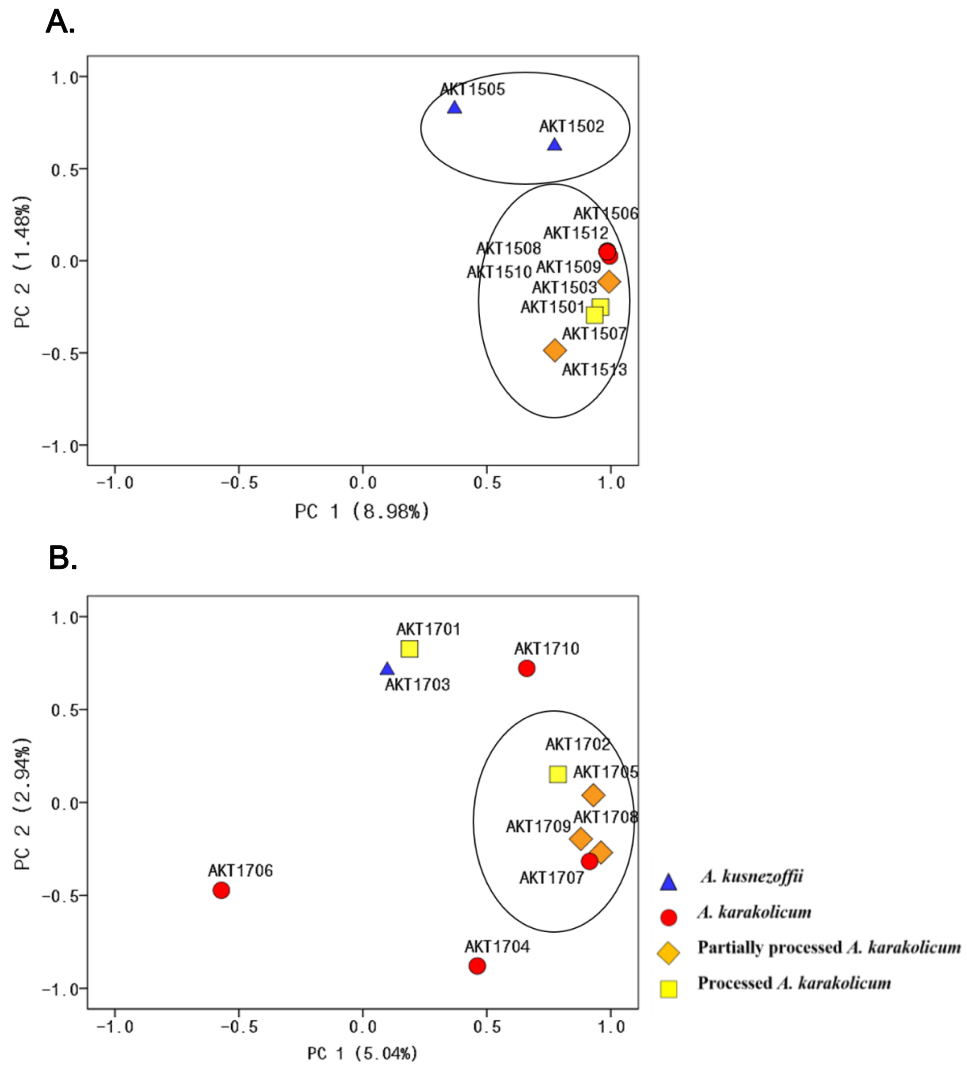


Fig. 4. PCA projection of 21 samples of *Aconiti Kusnezoffii* Tuber (A) 2015 samples, (B) 2017 samples.

## 4. 고찰

국내 시장에서 유통되고 있는 초오를 nrDNA 의 ITS 1 염기서열의 비교 분석을 통하여 확인한 결과 *A. kusnezoffii* 이삭바꽃 혹은 *A. jaluense*(=*A. triphyllum*) 투구꽃인 것을 확인할 수 있었으며, 중국에서 수입된 초오는 모두 *A. karakolicum* 인 것으로 판명되었다. 더욱이 국내산으로 표시되어 있는 제품에서도 *A. karakolicum* 이거나, 혹은 일부 혼재되어 있는 것이 확인되었다. 특히, *A. karakolicum* 은 급성 중독을 일으키는 성분이 다량 포함되어 있으므로, 국내 유통 중인 초오의 기원식물 확인을 위한 세심한 절차와 원산지 표시에 대한 철저한 감독 관리가 필요하다. ICH 가이드라인을 준수하여 초오의 지표성분 benzoylmesaconine, benzoylaconine, mesaconitine, aconitine, hyaconitine 에 대한 HPLC 동시분석법은 DNA 감별법과 더불어 국내 시장에 유통되고 있는 초오의 성분들을 정량함으로써 초오의 품질관리 및 표준화에 필요한 중요한 결과를 제시하고 있다. 21 개 시료의 HPLC 함량분석으로 추측한 초오의 기원과 DNA 분석 결과는 일치하였다. DNA 분석 결과로 확인된 *A. kusnezoffii* 는 HPLC 함량분석에서 mesaconitine(3)의 함량이 높은 것으로 확인하였다. DNA 분석 결과로 확인된 *A. karakolicum* 은 HPLC 함량분석 결과, 포제의 정도에 따라 mesaconitine(3)이 benzoylmesaconine(1)으로의 함량 변화가 컸을 것으로 생각된다.

### III. 백 부 자

#### 1. 서 론

우리나라는 백부자의 기원식물을 *Aconitum koreanum* Raymond 백부자로 대한민국약전외한약(생약)규격집에 규정하고 있다.<sup>2)</sup> 백부자는 이름에서 알 수 있듯이 미나리아재비과 부자속의 한 종으로 ‘백부’ 또는 ‘관백부’, ‘노랑돌쩌귀’의 이명을 가지고 있으며 <sup>20)</sup> 초오와 동일하게 식품에 사용할 수 없는 원료로 독성주의 한약재이다.<sup>2)</sup> Aconitine, hyaconitine, atisine, lucidusculine, cobusine 등 기타 alkaloid 를 포함하고 있고, 중풍실음, 두통, 중풍구안와사 등에 응용한다.<sup>21)</sup> 또한 한의학에서 화담지해평천약으로 조습화담, 거풍지경 효능이 있고, 편두통과 식풍지경에 주로 사용하였다.<sup>22)</sup> 백부자의 기원식물로 공정서에 기재되어 있는 *A. koreanum* 은 최근 분류학적 처리에 따라 *A. coreanum* (H.Lev.) Rapaics 으로 바르게 표기되어야 한다.<sup>23)</sup>

한편, 중국 약전에서 백부자는 *Typhonium giganteum* 독각련의 덩이줄기를 말린 것으로 정의되어 있다.<sup>7)</sup> 거풍담, 정경혹, 해독산결, 지통의 효능이 있으며, 중풍담옹, 구안괘사, 어언건삽, 경풍전간, 파상풍, 담궤두통, 편정두텅, 나력담핵, 독사교상 등에 주치로 쓰여 왔다.<sup>7)</sup> 한때 ‘우백부’ 라는 이명으로 사용되기도 했다. 이와 같이 우리나라 백부자와 기원식물이 전혀 다르지만 한약재 이름이 같아 중국으로부터 백부자를 수입할 경우 국내에서 독각련이 백부자로 유통될 가능성이 있다. 또한, 백부자와 독각련은 기원식물과 구성 성분도 다르기 때문에 효능과 안전성에도 차이가 있다.<sup>24,25)</sup> 중국 약전에 백부자는 3~6 g 의 용량을 사용하도록 규정하고 있고, 일반적으로 포제한 뒤에 사용하며, 외용시에는 생품을 적당량 짓찧어서 고약처럼 줄이거나 가루 내어

술에 개어 환부에 붙인다고 쓰여있다.<sup>7)</sup> 중국 약전에도 *A. coreanum* 백부자의 덩이뿌리를 한약재로 사용하고 있는데, 우리나라와 다르게 ‘관백부’ 생약명으로 부록에 명시되어 있다.<sup>7)</sup> 중국에서는 생약 백부자와 관백부가 구별되어 사용되고, 우리나라는 생약 백부자를 관백부 이명으로 동일한 것으로 사용되기 때문에 백부자는 국내 시장에서 많은 혼란이 있다.

2001 년 산림청은 *A. coreanum* 백부자를 희귀식물로 지정하고, 환경부는 멸종 위기 야생식물 2 급으로 지정하면서 백부자는 국내 채취가 불가하게 되었다. 그러나, 우리나라에서 백부자를 재배하는 농가는 없는 것으로 파악되나 현재 많은 양의 국산 백부자가 유통되고 있다. 국산 백부자는 대부분 돼지감자가 유통되는데, 돼지감자는 *Helianthus tuberosus* 뚱딴지의 이명이다.<sup>20)</sup> 뚱딴지는 국화과 해바라기속에 속하지만 독각련의 외형과 유사하여 국내에서 백부자로 유통되고 있다. 이처럼 국내에 유통되고 있는 백부자는 미나리아재비과의 *A. coreanum* 백부자와 천남성과의 *T. giganteum* 독각련, 국화과의 *H. tuberosus* 뚱딴지로 각기 다른 세 가지 과가 사용되고 있는 큰 문제점이 있다.

백부자의 확인시험법으로 지표성분인 Guanfu base, Guanfu base Q, Guanfubae Z, Hetisinone, Hetisine, Guanfu base AA 등의 분석법이 Wang, X. et al. (2014)에 제시되어 있고 <sup>26)</sup> HPLC 를 이용한 부자의 분석법은 보고되어 있지만,<sup>19)</sup> 백부자의 성분 프로파일링 분석은 보고되지 않다. 이에 본 연구는 유전자 감별을 통해 백부자의 기원식물을 판별하여 무분별한 유통과정의 문제를 밝히고, HPLC 와 UPLC 분석을 이용하여 화학적 성질의 차이를 파악하고자 한다.



## 2. 재 료

국내에서 유통되고 있는 백부자 16 개를 2015 년 및 2019 년 두 차례에 걸쳐 생약재 시장에서 수집하여 DNA 분석을 실시하였다. 백부자의 기원식물로 공정서에 기재되어 있는 *A. coreanum*(=*A. koreanum*) 백부자의 DNA 분석은 국내에서 직접 채집되어 동정이 확정된 후, 국립수목원 식물표본관(KH)에 소장되어 있는 식물표본에서 채취한 소량의 잎으로 이루어졌다(Table 2). 국산 백부자로 유통되고 있는 *H. tuberosus* 뚱딴지의 ITS 염기서열은 GenBank 데이터베이스를 검색하여 확인하였다(Table 2). *A. coreanum*의 ITS 분석에 사용된 백부자 시료의 증거표본은 서울대학교 약학대학 자원식물표본관(NPRI)에 소장되어 있다(Table 1).

## 3. 방 법

### 1) 유전자 분석

백부자의 유전자 분석을 위한 DNA 추출과 PCR 증폭 및 정제, 염기서열 결정 및 비교 분석은 초오와 동일하다(4~7 페이지 참고).

### 2) HPLC 비교 분석

**HPLC 분석조건** – HPLC 분석에 사용한 백부자의 추출 방법과 분석 조건은 초오와 동일하다(7~8 페이지 참고). 주입 용량은 30  $\mu$ l 로 설정하였다.

**UPLC 분석조건** – UPLC 분석을 위한 기기로는 Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system (Thermo), Triple quadrupole Time-of-Flight (TripleTOF) mass spectrometer (AB SCIEX), Electrospray Ionization (ESI) positive ion mode 를 이용하였다. 분석용 칼럼은 Hypersil Gold (2.1 $\times$ 100 mm, 1.9  $\mu$ m)을 사용하고, Column oven 의 온도는 40 $^{\circ}$ C 로 설정하였다. 시료 1.0 g 에 diethyl ether 와 ammonia

9:1 비율의 혼합액을 추출용매로 30 분간 초음파를 이용하여 성분 추출한 후 0.45 PTFE membrane 필터를 이용하여 여과하였다. 여과액을 acetonitrile 과 4:1 로 희석하여 분석용 시료로 하였다. UPLC 이동상으로 A(0.1% formic acid 가 첨가된 distilled water)와 B(0.1% formic acid 가 첨가된 acetonitrile)의 혼합액을 이용하였다. UPLC 구배 조건은 0-3 분(20-30% B), 3-10 분(30% B), 10-20 분(30-50% B), 20-30 분(50-55% B), 30-40 분(55-75% B), 40-45 분(75- 100% B)이다. 유속은 0.4 ml/min 으로 하였다. 주입 용량은 1 µl 로 설정하였다.<sup>27)</sup>

## 4. 결 과

### 1) 유전자 분석

2015 년, 2019 년 두 차례에 걸쳐 국내 시장에서 16 개의 백부자를 수집하여 분석한 결과, D3, D4, D13 을 제외한 13 개의 시료에서 ITS 1 의 염기서열을 결정할 수 있었다(Fig. 5). 백부자의 기원식물로 정의된 *A. coreanum* 백부자의 ITS 1 은 국립수목원 표본관에 수집되어 있는 식물 건조표본 시료를 분석하여 확인하였다(Table 2). 또한 국내에서 국산 백부자로 잘못 유통되고 있는 것으로 알려진 *H. tuberosus* 뚱판지의 ITS 1 염기서열은 GenBank 데이터베이스에서 획득하였다(Table 2). ITS 1 구간의 염기서열의 비교 분석 결과, D2, D7, D8 는 261 bp 크기의 *A. coreanum* 백부자로 판명되었다. *Aconitum* 속의 식물 종으로 확인되는 D14 는 250 bp 크기로 백부자보다 11 bp 가 적었다. 한편으로 나머지 시료 9 개는 국화과의 *H. tuberosus* 뚱판지로 판명되었으며, 263 bp 의 ITS 1 을 가지며, 백부자와 현저한 차이를 나타내었다(Fig. 5, Table 7).

ITS 1 구간의 DNA 분석 결과, 국내산으로 표기된 9 개의 시료 D1, D5, D6, D9, D10, D11, D12, D15, D16 은 모두 *H. tuberosus* 뚱판지로 확인되었으며,

국내 품질 기준에 적합하지 않은 것으로 나타났다. 중국산 시료 7 개 중 D2, D7, D8 은 *A. coreanum* 백부자로 확인되어 중국에서 수입하는 백부자라 하더라도 국내 기준에 적합할 수 있다는 것을 보여주었다. 그러나 DNA 분석이 불가능하였던 D3, D4, D13 도 모두 중국산이며, 이들은 외형으로도 나머지와 쉽게 구분되는 다른 식물로 보였기에 모든 중국산 백부자가 국내 정품이라고 판단하기는 어렵다.

2015 년에 수집한 백부자 시료 12 개 중 단 세 개만이 백부자 정품이었으며, 나머지는 똥판지와 독각련으로 국내 품질기준에 부합하지 않은 생약이 적나라하게 유통되는 것을 확인하였다. 추후에 이차로 수집한 2019 년 백부자 시료 역시 똥판지와 독각련으로 판단되는 식물이 여전히 유통되고 있는 실정은 4 년이 지난 현재에도 국내 생약 시장 내 품질 관리가 제대로 이루어 지지 않고 있다는 점을 보여준다.

**Table 7.** Crude drugs used for DNA and HPLC analyses to identify *Aconiti Koreani* Tuber collected on the market

Sample No.	Source labeled on merchandise	Species identified by DNA analysis	Species identified by HPLC analysis
D1	Local market; Korea, 30 Apr 2015	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>H. tuberosus</i>
D2	Imported; China, 30 Apr 2015	<i>Aconitum coreanum</i>	<i>A. coreanum</i>
D3	Local market; China, Henan, 28 May 2015	N.D.	<i>Typhonium giganteum</i>
D4	Local market; China, Jiangxi, 28 May 2015	N.D.	<i>T. giganteum</i>
D5	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong, 10 Jul 2015	<i>H. tuberosus</i>	<i>H. tuberosus</i>
D6	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong, 10 Jul 2015	<i>H. tuberosus</i>	<i>H. tuberosus</i>
D7	Imported; China, 10 Jul 2015	<i>A. coreanum</i>	<i>A. coreanum</i>
D8	Imported; China, 19 Mar 2015	<i>A. coreanum</i>	<i>A. coreanum</i>
D9	Local market; Korea, Chonnam Prov: Hwasun, 24 Apr 2015	<i>H. tuberosus</i>	<i>H. tuberosus</i>
D10	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong, 24 Apr 2015	<i>H. tuberosus</i>	<i>H. tuberosus</i>
D11	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Bonghwa, 24 Apr 2015	<i>H. tuberosus</i>	<i>H. tuberosus</i>
D12	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong, 31 Jul 2015	<i>H. tuberosus</i>	-
D13	Imported; China, 12 Apr 2019	N.D.	-
D14	Imported; China, 12 Apr 2019	<i>Aconitum</i>	-
D15	Local market; Korea, 12 Apr 2019	<i>H. tuberosus</i>	-
D16	Local market; Korea, Gyeongbuk Prov: Uiseong, 12 Apr 2019	<i>H. tuberosus</i>	-

18S										ITS1									
-10										10 20 30 40 50 60 70 80									
KHB1321547	AGGATCATTTG	TCGAAACCTG	CCCAGCAGAG	CGACCCCGGA	ACAAAGTGAAA	ACA--AAA--	CCGGAC--GG	ACCG-----A	AGAGGGGCGC										
D2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D7	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
KX671858	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D5	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D10	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D11	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D12	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D15	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D16	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
90										100 110 120 130 140 150 160 170									
KHB1321547	ATGCCCCCGA	TGCCCCGCC	ATCGGACCGC	GACCTCTT-C	TGCGACCGCA	CTGATTGTG	GGTGGAGGGG	TGGGTGTGTG	AGTCGCGACA										
D2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D7	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D14	CGGT.G----	C.AT.G.A.	.....	GACCT.TT	CTG.GACCG	ACT..T-TG	.G.-G.G.A-	-.G.-GT..T	.TTG..CC	GC-----ACA.									
KX671858	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D1	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D5	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D6	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D9	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D10	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D11	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D12	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D15	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
D16	TC.G-----	.T.TGA.T.	T.GTTGA.T	.CGT.A.G.G	ATG...AT.	CT-.G.T	T..C-.T.A	.TCA....	.C-----A.A.										
180										190 200 210 220 230 240 250 260									
KHB1321547	AAACCAAAA	CGGCGCGCAG	AGGCGCCAAG	GAAATCTTAG	CGGAAAGA--	--GGGCTT--	--CCCGCTT	CGCGGAG--	GCAGTCTTCA										
D2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D7	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D8	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
D14	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....										
KX671858	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D1	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D5	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D6	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D9	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D10	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D11	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D12	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D15	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
D16	T...A.CCC	...A..G	T.T.T....	...A.CA.A	ATT...AC	CC.T..GTT	GCG.....	...T.TGC	.GC.G...G										
270										280									
KHB1321547	-GAATCCGAT	----ACTCAA	A-CGACTC																
D2	.....	.....	.....																
D7	.....	.....	.....																
D8	.....	.....	.....																
D14	G-----T..	CCGATACTC	.A.....																
KX671858	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D1	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D5	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D6	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D9	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D10	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D11	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D12	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D15	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
D16	T.GC.T.TT	GTAA...T.	.A.....																
5.8S																			

Fig. 5. Aligned sequences of nrITS region from 16 samples of *Aconiti Koreani* Tuber and additional sequences for comparative purpose. Shaded are the ITS 1 sequences identified from the plant materials of *Aconitum coreanum* (KHB1321547), and the sequence of *Helianthus tuberosus* obtained from GenBank (KX671858). D14 belongs to *Aconitum*.

## 2) HPLC 비교 분석

**HPLC 분석** – 2015 년 수집 11 개의 백부자 시료는 HPLC 를 이용하여 분석한 결과, *A. coreanum* 백부자를 뚜렷하게 구별할 수 있었으며, 크로마토그램의 양상이 나누어지는 것을 확인하였다(Fig. 6, Table 7). D2, D7, D8 는 20 분과 30 분에서 특이적 피크를 보였으며 세 가지 시료가 같은 종으로 판단되었고(Fig. 6-A), DNA 분석 결과와 동일하게 백부자 정품인 것으로 확인되었다(Table 7). 백부자로 판명된 시료를 제외한 것 중 D6 과 D9 는 서로 같은 크로마토그램 양상을 보였고(Fig 6-B), DNA 분석 결과에 따라 뚱판지인 것으로 확인되었다. 나머지 시료 D1, D3, D4, D5, D10, D11 은 어떠한 피크도 나타나지 않았으며(Fig. 6-C), 이 중에는 뚱판지와 백부자가 섞여있는 것으로 두 식물의 구별이 불가하였다.

**UPLC 분석** – 2015 년 수집 11 개의 백부자 시료를 UPLC 분석을 통하여 HPLC 에서 확인 불가하였던 종의 구별을 특징지을 수 있었다. Diethyl ether 추출물에서 D2, D7, D8 은 4.1 분에 특이적인 피크가 동일하게 관찰되었고(Fig. 7-A), 나머지는 검출되지 않았다. 이는 앞선 HPLC 분석 결과와 마찬가지로 백부자인 것으로 판단되었다. 나머지 8 개 시료의 추가적인 구분을 위해 EtOH 추출물에서 chlorogenic acid 성분을 분석한 결과는 Fig. 7-B 이다. D1, D5, D6, D9, D10, D11 여섯 가지는 3.2 분에 chlorogenic acid 가 검출되었고(Fig. 7-B), 뚱판지로 판명되었다. 백부자로 판명된 D2, D7, D8 은 3.05 분에 피크가 나타났다(Fig. 7-B). DNA 분석이 불가하였던 D3 과 D4 는 chlorogenic acid 성분이 검출되지 않았고(Fig. 7-B), 독각련으로 확인되었다. EtOH 추출물을 이용한 UPLC 분석을 통해 백부자와 뚱판지, 독각련 세 가지 식물을 모두 구분할 수 있었다.

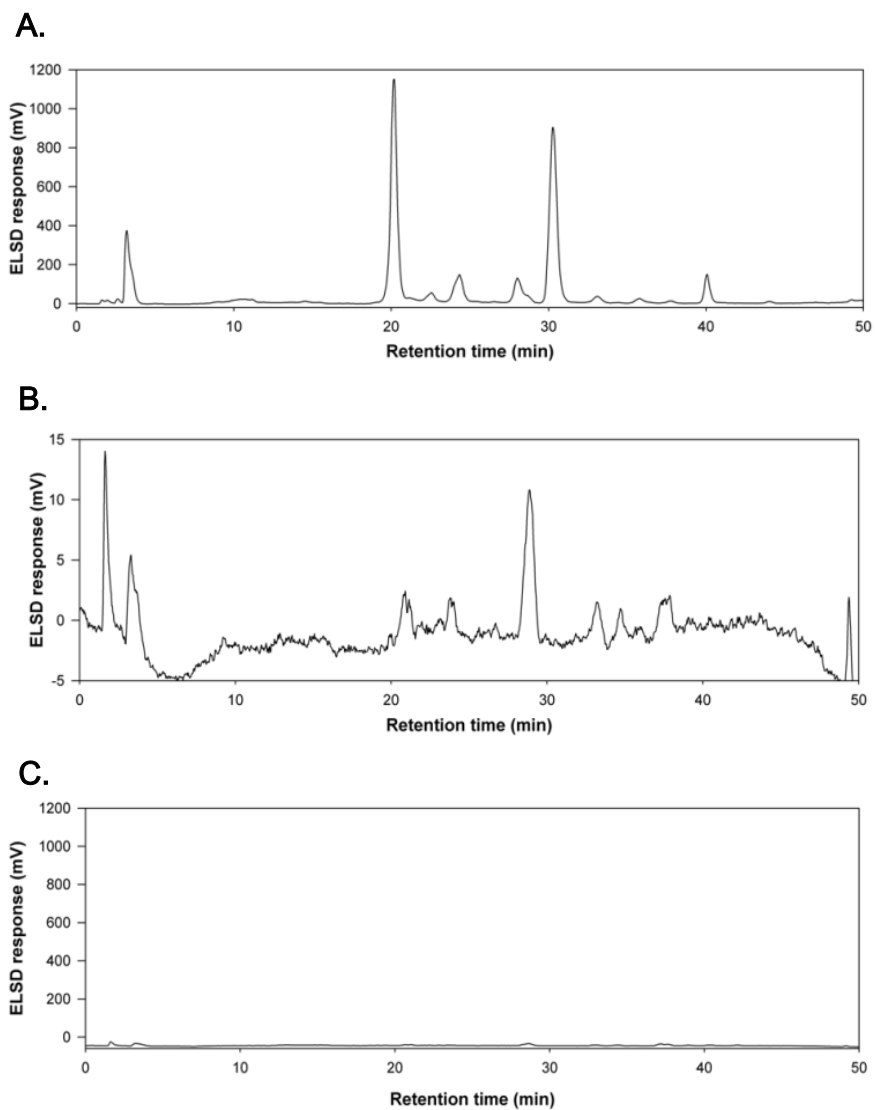


Fig. 6. Representative HPLC chromatograms of Aconiti Koreani Tuber on 2015. (A) D2; *Aconitum coreanum*, (B) D6; *Helianthus tuberosus*, (C) D1; *H. tuberosus*

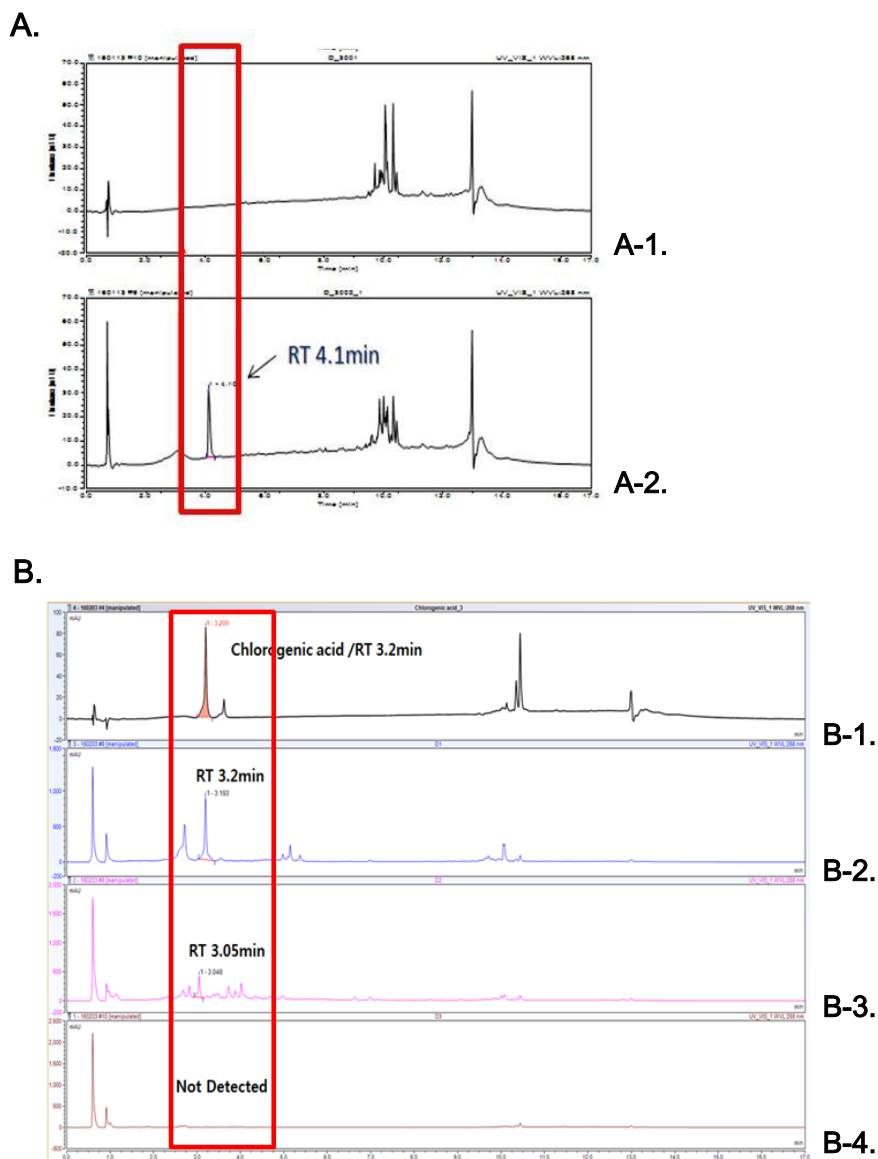


Fig. 7. Representative UPLC chromatograms of *Aconiti Koreani* Tuber on 2015. (A) LC-UV (268nm) chromatogram of extract diethylether, (A-1) D1; *Helianthus tuberosus*, (A-2) D2; *Aconitum coreanum*, (B) LC-UV (268nm) chromatogram of extract of 70% ethanol, (B-1) standards, (B-2) D1; *H. tuberosus*, (B-3) D2; *A. coreanum*, (B-4) D3; *Typhonium giganteum*



## 4. 고찰

국내 시장에서 16 개의 백부자를 수집하여 분석한 결과, 유전자 염기서열 분석을 통해 3 개는 *A. coreanum* 백부자로 판명되었고, 1 개는 *Aconitum* 속의 식물 종으로, 9 개 시료는 *H. tuberosus* 뽕딴지로 판명되었다. 국산 백부자는 *A. coreanum* 백부자가 아니었으며 모두 뽕딴지로 확인되었다. 오히려 중국산 백부자에서 국내 정품 백부자를 확인할 수 있었고, *T. giganteum* 독각련으로 판단되는 형태가 완전히 다른 종도 백부자로 유통되고 있었다. 2015 년과 2019 년 두 차례에 걸쳐 수집한 국내 유통과정 중 백부자는 여전히 품질기준에 적합하지 않는 식물이 사용되고 있었다. 4 년이라는 시간이 지나도 생약 시장의 문제는 쉽게 바뀌지 않았다. 이로써 생약의 품질 관리를 위해 더욱 규제를 강화한 감독이 필요하며 지속적인 관리가 시행되어야 한다.

또한, HPLC 와 UPLC 를 이용한 화학적 분석 결과는 DNA 분석 결과와 일치하였다. 백부자는 성분 프로파일링 분석이 이전까지 보고되지 않았으나 본 연구의 HPLC 분석을 통하여 분석 조건을 확립하였다. 추출 방법에 따라 백부자와 돼지감자, 독각련이 구분되었다. 먼저, diethyl ether 추출물에서 4.1 분에 검출된 피크에 의하여 백부자와 돼지감자·독각련으로 구분 지을 수 있으며, EtOH 추출물의 chrologenic acid 검출에 의해 돼지감자와 독각련으로 각각 구분할 수 있다. 이는 백부자의 기원확인 및 모니터링 분석 시 가이드라인으로 제시될 수 있다. 특히, 백부자는 공정서 상에 지표성분이 알려져 있지 않은데, 백부자 시료로 확인되는 세 가지 시료의 UPLC 분석 결과의 특이적인 피크는 추후 분리 정제하면 백부자의 지표물질로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

이로써, 현재 국내에서 유통되고 있는 백부자는 본 연구 결과 기원에 적합하지 않은 종을 포함하여 세 가지 이상의 다른 종이 무분별하게 섞여 있는 것으로 확인되었고, 생약의 유통과정 중 기본적으로 수행되어야 하는 기원식물을 확인하는 과정이 반드시 필요하다는 것을 제시하였다. 뽕판지가 백부자로 유통될 경우 원하는 약효를 기대할 수 없고, 뽕판지로 안정성 등의 연구가 진행되어 발표된다면, 국산 백부자는 독성이 없는 안전한 한약재로 잘못 보고될 수 있으므로 뽕판지가 백부자로 유통되는 것은 금지시켜야 할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 제시한 화학적 분석법이 백부자의 품질을 평가하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## IV. 마 황

### 1. 서 론

마황은 마황과에 속하는 *Ephedra sinica* 초마황, *E. intermedia* 중마황 또는 *E. equisetina* 목적마황의 지상부를 사용한다고 대한민국약전에 정의되어 있다.<sup>1)</sup> 한의학에서 마황은 발산풍한약으로 발한산한, 선폐평천, 이수소종의 효능이 있고, 풍한감모, 풍수부중, 흥민천해, 기관지효천, 윤패지해 등 병증에 주로 사용되었다.<sup>28,29)</sup> 한편, 마황의 뿌리를 사용하는 마황근은 <sup>1)</sup> 지한약으로 수렴지한의 효능이 있어 지상부와 반대의 효능을 가진다.<sup>29)</sup> 마황은 지상부와 뿌리의 각기 다른 효능으로 한의학에서 다방면으로 사용되었고, 오늘날에는 일상에서도 감기 치료제 성분이나 다이어트식품의 원료로 꾸준히 사용되고 있는 생약이다.<sup>30-33)</sup>

마황의 주성분은 alkaloid 계열로 ephedrine 과 pseudoephedrine 두 가지 지표성분이 있으며,<sup>28)</sup> 두 성분은 향정신성 의약품 원료이다.<sup>34)</sup> ephedrine 은 항우울제에 사용되고,<sup>35)</sup> pseudoephedrine 은 기관지염, 천식 및 콧물감기 치료에 주성분으로 쓰인다.<sup>36)</sup>

체중 감량의 목적으로 비만 치료제 및 기타 생약제로 다이어트식품의 원료에 사용되어온 마황은 유럽과 미국, 여러 나라에서 사용되어왔다. 그러나 2004 년 미국 FDA 는 마황의 극심한 부작용 사례 증가로 마황을 식품 및 식품원료로 사용되는 것을 전면 금지하면서 ephedrine 과 pseudoephedrine 의 하루 권장 사용량을 각각 150 mg, 240 mg 으로 규제하였다.<sup>37)</sup> 이와 더불어 국내 대한 한의사 협회는 미국 FDA 와 동일한 기준을 적용하였으나,<sup>38)</sup> 대한 의사 협회는 마황의 ephedrine 함량을 하루 최대 61.4 mg 으로 규제하였다.<sup>39)</sup> 중국의 경우,

한약재로써 마황의 용량을 2~10 g 으로 제한하고 있으나 <sup>7)</sup> 국내 공정서는 용법 및 용량이 규제되어있지 않다. 국내 기관별 ephedrine 허용량의 차이로 논란이 계속되는 가운데 생약으로 섭취했을 때의 기준량이 명시되어있지 않아 생약으로 사용될 때 허용 기준 필요성이 요구된다.

마황은 4-30 mm 절편 형태로 유통되기 때문에 외관상 그 기원식물을 구별하기가 매우 어렵다. Desert Herb 라는 이명에서 알 수 있듯이, 사막과 건조한 모래땅에서 자라며 중국 북부와 몽골이 원산지이다. 그러나 최근 수입 다변화에 의하여 중앙아시아 등에서도 수입되며, 한의원에서는 파키스탄산 마황의 사용이 점차 늘어나는 추세이다.<sup>4)</sup> 김병출 등은 2014 년 중국산 마황과 파키스탄산 마황으로 조성된 강지환의 체중 감량 효과 비교를 고지방식이 비만 마우스 모델에서 시행하였다.<sup>4)</sup> 파키스탄산 마황이 중국산보다 체중 감량 효과가 컸으나, 이 둘의 효과 차이는 통계적인 범위 안에 있어 크게 다르지 않은 것으로 나타났다.<sup>4)</sup> 한편, 최근 수입되는 파키스탄산 마황의 기원식물을 확인한 선행연구가 없어 본 연구에서 유전자 염기서열 분석을 통해 현재 국내에서 유통되고 있는 마황의 기원식물을 확인하였다. 또한 ephedrine 을 정량하여 실제로 한약으로 사용되는 양이 국내 허용량 기준에 적합한지를 확인하였다.

## 2. 재 료

국내에서 유통되고 있는 마황 8 개를 2019 년 생약재 시장에서 수집하여 DNA 분석을 실시하였다. 마황의 기원식물로 공정서에 기재되어 있는 *Ephedra sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* 의 trnK 염기서열은 GenBank 데이터베이스를

검색하여 확인하였다(Table 2). DNA 분석에 사용된 마황 시료의 증거표본은 서울대학교 약학대학 자원식물표본관(NPRI)에 소장되어 있다(Table 1).

### 3. 방 법

#### 1) 유전자 분석

마황의 DNA 추출 방법과 PCR 증폭 후 염기서열 결정 및 비교 분석법은 초오, 백부자와 동일하다(4~7 페이지 참고).

**PCR 증폭 및 정제 (PCR 기법을 이용한 trnK 유전자 증폭)** – 속씨식물의 DNA 염기서열 분석에 사용되는 23 개의 유전자 중에서 가장 변동이 심한 유전자 중 하나인 엽록체 DNA 의 trnK 구간을 증폭하였다.<sup>40)</sup> 특히 이 중에서 단백질 유전자 구간인 matK 구간의 염기서열을 비교 분석하였다. PCR 증폭은 Takara Ex Taq(Takara Bio Inc., Japan)를 사용하여 수행하였는데, 50 µl 반응액은 10 x Ex Taq 완충용액 5 µl, dNTP 4 µl, MgCl<sub>2</sub> 3 µl, Takara Ex Taq 0.25 µl, DDW 31.75 µl, 각 primer 2 µl 와 추출 DNA 2 µl 를 포함하도록 하였다. PCR 유전자 증폭에 사용된 primer 는 Kitani Y. et al. (2009)를 참고로 Macrogen 에서 oligo 합성을 주문하여 사용하였다(Table 3).<sup>41)</sup> PCR 은 region 1 과 reion 2 로 나누어 region 1 구간은 trnK 3914F(5'-GGG-GTT-GCT-AAC-TCA-ACG-G-3')와 trnK In 3R(5'-CTT-TAG-CAA-TCT-TAT-CGT-GTC-TTT-3') primer 를 사용하고, region 2 구간은 trnK In 2F(5'-AAT-TTT-CAA-TCA-GTC-TTT-TCT-CTA-3')와 trnK 2R(5'-AAC-TAG-TCG-GA-T-GGA-GTA-G-3') primer 를 사용하여 증폭하였다. 또한 추가적으로 trnK In 3F (5'-ATT-GAT-TTT-GCT-GGG-AAC-TAC-TAT-3')와 trnK In 2R(5'-ACG-TTT-ATT-TAT-TGC-TTC-ACT-GTA-3') primer 를 이용하여 trnK 전체 구간을 얻는데 사용하였다(Table 3). PCR 조건은 94°C 에서 3 분간 전처리, 그리고 94°C 50 초, 55°C

50 초, 72°C 1 분 45 초의 과정을 35 회 반복한 후, 72°C 에서 20 분간 최종 처리로 이어지는 과정으로 진행하였다.<sup>41)</sup> PCR 산물은 반응 완료 후, 0.7% agarose gel 에서 50 V 로 50 분간 전기영동하여 증폭을 확인한 후, High Pure PCR Product Purification Kit(Roche, Germany)를 사용하여 정제하였다. 이후 염기서열 분석 실험 시까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다.

## 2) HPLC 비교 분석

HPLC 분석을 위한 기기로는 Hewlett-packard, HP1100(Agilent Tech)을 이용하였고, 분석용 칼럼은 Inno column C<sub>18</sub>(4.6×150 mm, 5 µm, YoungJin Biochrom Co. Ltd., Korea)을 사용하였다. 시료 500 mg 에 15 ml MeOH 을 추출 용매로 사용하여 30 분간 초음파를 이용하여 성분 추출하고, 이를 2 회 반복 하였다. 여과한 30 ml 추출액을 농축한 후, HPLC 용 MeOH 을 이용하여 3 mg/ml 농도로 제조하였다.<sup>42)</sup> 0.45 PTFE membrane 필터를 이용하여 여과한 후 HPLC 분석용 시료로 하였다.

**HPLC 표준액 및 검체의 조제** - ephedrine 분석용 표준품을 서울대학교 성상현 교수님 연구실에서 제공받아 사용하였다. 표준품 4.5 mg 을 MeOH 1.5 ml 에 녹여 3 mg/ml 농도로 제조 후 냉장 보관하여 분석 전에 희석하여 사용 하였다.

**분석조건** - 마황 8 개 시료의 ephedrine 함량분석을 위해 다음의 조건으로 분석하였다. HPLC 이동상으로 A(0.1% phosphoric acid 이 첨가된 distilled water)와 B(acetonitrile)를 90:10 혼합 비율로 이용하였다. 유속은 1.0 ml/min 으로 하고, 주입 용량은 10 µl 로 설정하였다.

**직선성** - ephedrine 을 MeOH 에 3 mg/ ml 농도로 녹인 후 100, 500, 1000, 2000, 3000 µg/ml 로 총 5 개의 구간을 설정하여 3 회 반복 측정 후 작성된 검량선의 상관계수(R<sup>2</sup>)로 직선성을 평가하였다.

**분석법의 검증, 검출한계와 정량한계, 함량분석** – 방법은 초오와 동일하게 진행하였다(8~9 페이지 참고).

## 4. 결 과

### 1) 유전자 분석

2019 년 국내 시장에서 8 개의 마황을 수집하여 분석한 결과, 모든 시료의 trnK 의 염기서열을 결정할 수 있었다(Fig. 8). 마황의 기원식물로 정의된 *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* 의 trnK 염기서열은 GenBank 데이터베이스에서 획득하여 분석에 사용하였다(Table 2).

염기서열의 비교 분석 결과, 전체 시료에서 2200~2275 bp 의 trnK 를 확인하였다(Fig. 8). 6 개의 중국산 마황은 *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* 세 종으로 확인되었으며, 각 시료 EH1801 은 *E. interdia* 로, EH1802 와 EH1805 는 *E. sinica* 로, EH1803, EH1804, EH1806 은 *E. equisetina* 로 판명되었다(Fig. 8, Table 8). 한편, 나머지 시료 파키스탄산 EH1807 와 EH1808 은 *E. equisetina* 로 확인되었다(Fig. 8, Table 8). 이는 모두 공정서에 기준 적합한 식물로 확인되었다.

*E. sinica* 와 *E. equisetina* 로 확인된 시료는 trnK 약 2200 bp 중 1662 bp 의 matK 단백질 구간을 가지고 있으며, *E. equisetina* 는 *E. sinica* 와 비교했을 때 1662 bp 의 matK 구간 중 8 bp 차이가 있다(Fig. 8). matK 구간을 protein alignment 했을 때, *E. sinica* (EH1802)와 *E. equisetina* (EH1803)은 553 amino acid(aa)를 가지고 있으며, 두 종은 5 aa 차이가 있다(Fig. 9).

*E. intermedia* 로 판명된 EH1801 은 *E. sinica* 또는 *E. equisetina* 와 다르게 특이적으로 앞부분에 38 bp 의 삽입 구간이 있으며, 이를 제외하고는 *E. sinica* 와 1 bp 차이가 나는 것으로 확인되었다(Fig. 8). 이는 Kitani Y. et al. (2009)의

몽골로부터 얻은 마황을 분석한 결과와 일치하였다.<sup>41)</sup> EH1801 은 2275 bp 의 trnK 구간에서 138 bp 또는 1700 bp 의 matK 구간을 가지고 있는 것으로 보이는데, *E. sinica* 또는 *E. equisetina* 의 matK 시작코돈과 동일하게 500 bp 에서 단백질 번역을 시작했을 때, *E. intermedia* 는 45 aa (138 bp)를 가지는 것으로 판단된다 (Fig. 9-A). 45 aa 중 *E. intermedia* 는 *E. sinica* 와 10 aa 차이를 나타내고 *E. equisetina* 와 11 aa 차이를 나타낸다(Fig. 9-A). 그러나 matK 시작코돈을 992 bp 로 했을 때 뒷부분에서 389 aa (1700 bp)를 가지는 것으로 판단되며, 이는 *E. sinica* 또는 *E. equisetina* 의 후반부 matK 구간과 일치하지만 전반부 164 aa 가 결여된 것으로 판단된다(Fig. 9-B). 389 aa 중 *E. intermedia* 는 *E. sinica* 또는 *E. equisetina* 후반부와 동일한 단백질 구간을 나타내었다(Fig. 9-B).



**Table 8.** Crude drugs used for DNA and HPLC analyses to identify Ephedrae Herba collected on the market and contents of ephedrine

Sample No.	Country	Species identified by DNA analysis	Contents of compound (µg/ml)
EH1801	Imported; China, 1 May 2018	<i>Ephedra intermedia</i>	18.6 ± 0.4 (0.6%)
EH1802	Imported; China, 1 May 2018	<i>E. sinica</i>	24.4 ± 0.9 (0.8%)
EH1805	Imported; China, 1 May 2018	<i>E. sinica</i>	29.3 ± 1.1 (1.0%)
EH1803	Imported; China, 1 May 2018	<i>E. equisetina</i>	36.8 ± 1.8 (1.2%)
EH1804	Imported; China, 1 May 2018	<i>E. equisetina</i>	35.8 ± 6.7 (1.2%)
EH1806	Imported; China, 30 Aug 2018	<i>E. equisetina</i>	34.1 ± 0.3 (1.1%)
EH1807	Imported; Pakistan, 30 Aug 2018	<i>E. equisetina</i>	52.9 ± 0.7 (1.8%)
EH1808	Imported; Pakistan, 30 Aug 2018	<i>E. equisetina</i>	52.6 ± 2.3 (1.8%)

	trnK 3914F	trnK exon 1	trnK								
AB453807	TAGAGTACTC	GGCTTTTAA	TGCGATTTAA	TCAAGTTTTT	TACATTTTGA	AATGAAGTAA	AATTTTCGTC	AATATTAATC	AGTAATGATT	[90]	
EH1802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[46]	
EH1805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[56]	
AB453797	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[90]	
EH1801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[56]	
AB453795	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[90]	
EH1803	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[42]	
EH1804	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[56]	
EH1806	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[56]	
EH1807	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[56]	
EH1808	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[56]	
AB453807	ATTTTAGTAA	ACTACGACTT	ATCCTAGAAA	AAGGAAAAAA	AAGCATGTCG	CTTTTGGAAA	AACCTCTTTT	TTCAAAAAG	GTAAGATTTT	[180]	
EH1802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[136]	
EH1805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[146]	
AB453797	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[180]	
EH1801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[146]	
AB453795	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[180]	
EH1803	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[132]	
EH1804	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[146]	
EH1806	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[146]	
EH1807	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[146]	
EH1808	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[146]	
AB453807	CTATGAAATT	GAAGTTCAAT	CACCTTGTAG	TTAAAAAGTC	TATGGAAAAG	GGATAGCTTG	AATAATGAAC	AAACCTAGAA	GAACGAGTTT	[270]	
EH1802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[226]	
EH1805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[236]	
AB453797	.A.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[270]	
EH1801	.A.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[236]	
AB453795	.A.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[270]	
EH1803	.A.	-----	-----	-----	-----	-----	.G	-----	-----	[222]	
EH1804	.A.	-----	-----	-----	-----	-----	.G	-----	-----	[236]	
EH1806	.A.	-----	-----	-----	-----	-----	.G	-----	-----	[236]	
EH1807	.A.	-----	-----	-----	-----	-----	.G	-----	-----	[236]	
EH1808	.A.	-----	-----	-----	-----	-----	.G	-----	-----	[236]	
AB453807	CTGCTCTTCC	TAGCGAAGAG	AAAATGATTC	CTCTTATTAA	AAAGAAGTTA	AAAGCTTTTT	AGCAATCGAT	ATGGGAAGGT	TTTTCTCTGA	[360]	
EH1802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[316]	
EH1805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[326]	
AB453797	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[360]	
EH1801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[326]	
AB453795	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[360]	
EH1803	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[312]	
EH1804	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[326]	
EH1806	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[326]	
EH1807	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[326]	
EH1808	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[326]	
AB453807	AAAGGTCAGA	GAATTCATA	TCATAGAATC	CTAAAGACTT	TAAGATCGGT	GTGTAAAAAA	AATTAGTGTG	CTGGCCTGAA	TTTCATGAGT	[450]	
EH1802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[406]	
EH1805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[416]	
AB453797	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[450]	
EH1801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[416]	
AB453795	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[450]	
EH1803	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[402]	
EH1804	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[416]	
EH1806	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[416]	
EH1807	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[416]	
EH1808	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[416]	
AB453807	CAGGAGAAGC	CCTGGTTGCT	AAGATAAAAT	ATTTCGGTCT	TTTTTGGTGA	TGACGATTGA	GATTCCTTCT	TTTGAAAGTA	CTATTCGGTT	[540]	
EH1802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[496]	
EH1805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[506]	
AB453797	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[540]	
EH1801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[506]	
AB453795	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[540]	
EH1803	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.T	-----	[492]	
EH1804	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.T	-----	[506]	
EH1806	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.T	-----	[506]	
EH1807	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.T	-----	[506]	
EH1808	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	.T	-----	[506]	
AB453807	TATTCGGTTC	AAGCTAGATT	GTACTATGTG	TTATTTTATT	TCTAAAAAGA	AAGGTTTAGG	AGGTT----	-----	-----	[605]	
EH1802	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[561]	
EH1805	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[571]	
AB453797	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[630]	
EH1801	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	GTGTT	ATTTTATTC	TAAAAAGAA	[596]
AB453795	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	GTGTT	ATTTTATTC	TAAAAAGAA	[605]
EH1803	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[557]	
EH1804	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[571]	
EH1806	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[571]	
EH1807	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[571]	
EH1808	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[571]	

Fig. 8. Aligned sequences of trnK region from 8 samples of Ephedrae Herba and additional sequences for comparative purpose. The trnK sequences of *Ephedra* species obtained from GenBank: *Ephedra sinica* (AB453807), *E. intermedia* (AB453797) and *E. equisetina* (AB453795). Shaded are the primers used in this study.

AB453807	-----	---TTTTCTT	GAAAAAAAT	GAAACATAC	GTGGCAACA	ACATTTTTTA	TATCCCCTCT	TATCCATAA	CGATTTCAT	[682]
EH1802	-----	---	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[638]
EH1805	-----	---	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[648]
AB453797	GGTTTAGGAG	GTT.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[720]
EH1801	GGTTTAGGAG	GTT.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[686]
AB453795	-----	---	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[682]
EH1803	-----	---	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[634]
EH1804	-----	---	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[648]
EH1806	-----	---	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[648]
EH1807	-----	---	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[648]
EH1808	-----	---	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[648]
AB453807	GTTATAGATC	CGAATCTGTT	ATTCACACTAC	AGCCCTCTTT	TCGAAAAAT	AGAAAAATTA	CCTAATAGTT	TCCGTTTTT	GAATGTAATA	[772]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[728]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[738]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[810]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[776]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[772]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[724]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[738]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[738]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[738]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[738]
← trnK In 4R										
AB453807	CGTTCATTA	AGCTGTAC	TCAACAAAC	TATCTTGTGT	ATAATACAAG	AAGTTCTTGT	TTTAATTCCA	TGGAAAAAC	TTTTTTTTTC	[862]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[818]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[828]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[900]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[866]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[862]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[814]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[828]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[828]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[828]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[828]
trnK In 2F →										
AB453807	TGTTTGATA	TTTTTGTTT	CACGTGGTGG	AAACACTTTT	TTGGTTTCAA	AGTAACCTTC	AAAGAAATAA	ATCAACAGGT	CAATTTTCAA	[952]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[908]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[918]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[990]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[956]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[952]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[904]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[918]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[918]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[918]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[918]
→										
AB453807	TCAGCTTTT	CGCTATTTCT	TTTTTGGAA	GAAGTCTTTA	TGTTTCTCT	TTCTTTTTCT	AATATAAGAA	TACCCCTCTC	GATTCATCCA	[1042]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[998]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1008]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1080]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1046]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1042]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[994]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1008]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1008]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1008]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1008]
AB453807	GAGCTGTAA	TTAGACGTTT	CAAAATTTTCG	ATCAAGATG	TTCTTTTTTT	ACATTTTTTA	AGTTTTATAC	TTTTTTCAAA	GCAATTTAAG	[1132]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1088]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1098]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1170]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1136]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1132]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1084]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1098]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1098]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1098]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1098]
AB453807	TTTGTGAATA	ATTCTATTAT	TTTTCCAAAA	GGAAGTGTA	TTTCTCTGTT	CTTTTTAGGG	AATATCTCTC	TTTCTATTTT	CGAAGATTTT	[1222]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1178]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1188]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1260]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1226]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1222]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1174]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1188]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1188]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1188]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1188]

Fig. 8. Continued

AB453807	TTCACCTCTC	GATGGAAAAG	TTGTTTTTCAT	GA AAAATCAT	TGCTTATGG	TCTTTTTTCA	GAACAAAAGC	ATTTTCAACA	AAAATGGAAT	[1312]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1268]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1278]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1350]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1316]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1312]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1264]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1278]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1278]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1278]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1278]
<div> <div>trnK In 3R</div> <div>←</div> <div>trnK In 3F</div> <div>→</div> </div>										
AB453807	TTTTTAACCC	GA AAACCGAA	AAA AAAAGAC	ACGATAAGAT	TGCTAAAGGA	TTTTTTTTTT	CACATATATA	GATATGGGGA	AAAATTGATT	[1402]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1358]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1368]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1440]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1406]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1402]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1354]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1368]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1368]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1368]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1368]
<div> <div>TTGCTGGGAA</div> <div>→</div> <div>CTACTATTCT</div> </div>										
AB453807	TTGCTGGGAA	CTACTATTCT	AGTCAAAAAA	TGTGAATTTT	TTTCTTAA	TTTTTGGCAA	ACTTATCTTT	TTGTTTTATC	GGAACCTCT	[1492]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1448]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1458]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1530]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1496]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1492]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1444]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1458]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1458]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1458]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1458]
AB453807	AGTTTTTTTT	TGAAACAAAT	TTCCAGTCAA	AATATATTTT	TTCTAGCTTA	TTACTTAGAA	TATCCAACAA	ACTCTTTTTT	ACTCCGACTA	[1582]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1538]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1548]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1620]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1586]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1582]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1534]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1548]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1548]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1548]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1548]
AB453807	AATACTTAG	ATTATTTTCT	ATCTACTGAT	TTGTGTAGCA	GGGAATTAAA	TTCAAAACTT	AGCGCTGTTT	TTGTATTCA	ATTTTATCA	[1672]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1628]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1638]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1710]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1676]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1672]
EH1803	.....	G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1624]
EH1804	.....	G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1638]
EH1806	.....	G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1638]
EH1807	.....	G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1638]
EH1808	.....	G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1638]
<div> <div>trnK In 4F</div> <div>→</div> </div>										
AB453807	AAAGAAGGAT	TATGTGATAT	AATGGGTAAC	CGAAGAGTA	AATTAGCATG	GCTTAGTTTT	ACCGACAATT	CTATCTTGA	TAAATATGAT	[1762]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1718]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1728]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1800]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1766]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1762]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1714]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1728]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1728]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1728]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1728]
<div> <div>trnK In 2R</div> <div>←</div> </div>										
AB453807	CATTTTTCGA	GAAATGTAGA	TTCTTTTTC	AGTGGAGCAA	TAAATAAACG	TTTTTTAGAT	CGTGTGAAGT	ATATACTTTT	TCCTCATGT	[1852]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1808]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1818]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1890]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1856]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1852]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1804]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1818]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1818]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1818]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1818]

Fig. 8. Continued

AB453807	ATCAGAACCT	TAGCCTGTAA	GCATAAAAGT	ACGATACGTA	TAGTTCGAAA	AGAATTAGGA	TTTGAACCTAC	GTAATAATATT	TGTGCGAAAA	[1942]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1898]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1908]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1980]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1946]
AB453795	...A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1942]
EH1803	..A.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1894]
EH1804	..A.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1908]
EH1806	..A.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1908]
EH1807	..A.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1908]
EH1808	..A.A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1908]
AB453807	CAAGTTGAAT	TCAAAAACAA	AAATTTGCTA	TATTTCTGTT	TTCATAAACA	ATTTAGAAAA	TTGCTATTTA	AGATAGATT	AGTTACAGAA	[2032]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1988]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1998]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2070]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2036]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2032]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1984]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1998]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1998]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1998]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[1998]
AB453807	CGACTTTGGT	TTTGTAGATAT	TTTGGAGGTA	AATAATTTCA	CCAAGTTTGT	GGTAAAACAG	CAGAATGCTC	TGGATTTTTT	TTGTATTTTT	[2122]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2078]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2088]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2160]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2126]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2122]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T.....	.....	[2074]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T.....	.....	[2088]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T.....	.....	[2088]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T.....	.....	[2088]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	..T.....	.....	[2088]
trnK In 1R										
AB453807	GATCAAAATA	TTTGGTTTAT	GCTAGATCAA	TTTTTGTGAT	TTAATGAAAT	GCTTGTTTTG	CCGGTAGATG	TGAAATAGAA	ATAGAAAATA	[2212]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2168]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2178]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2250]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2216]
AB453795	.....C.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	[2212]
EH1803	.....C.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	[2164]
EH1804	.....C.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	[2178]
EH1806	.....C.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	[2178]
EH1807	.....C.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	[2178]
EH1808	.....C.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....	[2178]
AB453807	CAGAGAGAAA	GCCGTGTGCA	ATGAAAATTG	CAAGCACGGT	TTGGGAGGAG	ATTTTGAAT	TTTCTTGAAA	TATTCAAAAA	ATTGAATGAA	[2302]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2230]
EH1805	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2268]
AB453797	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2340]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2275]
AB453795	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2302]
EH1803	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2220]
EH1804	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2260]
EH1806	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2233]
EH1807	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2233]
EH1808	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[2240]
AB453807	ATGAT	[2307]	trnK 2R							
EH1802	-----	[2230]								
EH1805	.....	[2273]								
AB453797	.....	[2345]								
EH1801	-----	[2275]								
AB453795	.....	[2307]								
EH1803	-----	[2220]								
EH1804	-----	[2260]								
EH1806	-----	[2233]								
EH1807	-----	[2233]								
EH1808	-----	[2240]								

Fig. 8. Continued

## A.

EH1803	MTIEILSFES	TIWFIRFKLD	CTMCYFISK	KGLGGFFLKK	NENIRWQQHF	LYPLLFHND	YVIDPNLLFN	SSPSFEKIEK	LPNSFRFLNV	[90]
EH1802	.....	..R.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[90]
EH1801	.....	.....	.....	.....CVILF	LKRKV----	.....	.....	.....	.....	[45]
EH1803	KRSIKLLHQ	NYLVYNTSS	CFNFIGKTF	FCFDIFVSTW	WKHFFGFKVT	FKEINQQVNF	QSVFSLFLFL	EEVFMFSLSF	SNIRIPSSIH	[180]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[180]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[45]
EH1803	SELLIRRFKF	SIQDVSFLHF	LSFILFSKQF	KFVNNSIIFP	KGSVIFCFFL	GNILLSIFED	FFTLRWKSCF	HEKSLSYGLF	SEQKHQQKW	[270]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[270]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[45]
EH1803	NFLTRKPKKK	DTIRLLKDFP	FHYIRYGEKL	ILLGTTILVK	KCEFFFLNFW	QTYLFVLSEP	SSFFLKQISS	QNIFFLAYYL	EYPTNSFLLR	[360]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[360]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[45]
EH1803	LNILGYFLST	DFVSRELNSK	LSAVFVIQFL	SKEGLCDIMG	NPKSKLAWLS	FTDNSILDKY	DHFCRNVDSE	YSGAINKRFL	DRVKYILFLS	[450]
EH1802	....D.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[450]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[45]
EH1803	CIKTACKHK	STIRIVRKEL	GFELRKIFVR	KQVEFKNKKL	LYFCFHKQFR	KLLFKIDLVT	ERLWFLDILE	VNNFTKFWVK	QQNALDFFFI	[540]
EH1802	..R.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.	[540]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[45]
EH1803	FDQNICFMLD	QFL	[553]							
EH1802	....W....	...	[553]							
EH1801	.....	---	[45]							

## B.

EH1803	MTIEILSFES	TIWFIRFKLD	CTMCYFISK	KGLGGFFLKK	NENIRWQQHF	LYPLLFHND	YVIDPNLLFN	SSPSFEKIEK	LPNSFRFLNV	[90]
EH1802	.....	..R.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[90]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[0]
EH1803	KRSIKLLHQ	NYLVYNTSS	CFNFIGKTF	FCFDIFVSTW	WKHFFGFKVT	FKEINQQVNF	QSVFSLFLFL	EEVFMFSLSF	SNIRIPSSIH	[180]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[180]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[16]
EH1803	SELLIRRFKF	SIQDVSFLHF	LSFILFSKQF	KFVNNSIIFP	KGSVIFCFFL	GNILLSIFED	FFTLRWKSCF	HEKSLSYGLF	SEQKHQQKW	[270]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[270]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[106]
EH1803	NFLTRKPKKK	DTIRLLKDFP	FHYIRYGEKL	ILLGTTILVK	KCEFFFLNFW	QTYLFVLSEP	SSFFLKQISS	QNIFFLAYYL	EYPTNSFLLR	[360]
EH1802	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[360]
EH1801	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[196]
EH1803	LNILGYFLST	DFVSRELNSK	LSAVFVIQFL	SKEGLCDIMG	NPKSKLAWLS	FTDNSILDKY	DHFCRNVDSE	YSGAINKRFL	DRVKYILFLS	[450]
EH1802	....D.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[450]
EH1801	....D.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[286]
EH1803	CIKTACKHK	STIRIVRKEL	GFELRKIFVR	KQVEFKNKKL	LYFCFHKQFR	KLLFKIDLVT	ERLWFLDILE	VNNFTKFWVK	QQNALDFFFI	[540]
EH1802	..R.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.	[540]
EH1801	..R.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....C.	[376]
EH1803	FDQNICFMLD	QFL	[553]							
EH1802	....W....	...	[553]							
EH1801	....W....	...	[389]							

Fig. 9. Aligned proteins of matK region from 3 species of Ephedrae Herba. EH1801; *Ephedra intermedia*, EH1802; *E. sinica*, and EH1803; *E. equisetina*, (A) ORF (open reading frames) 5'3' Frame 3 of EH1801, (B) ORF 5'3' Frame 1 of EH1801.

## 2) HPLC 비교 분석

**직선성** - 지표성분 화합물 ephedrine 의 표준용액을 100, 500, 1000, 2000, 3000  $\mu\text{g/ml}$  의 5 가지 농도로 검량선을 작성하였다. 그 결과, 상관계수( $R^2$ )가 ephedrine 은 0.989 를 나타내어 높은 직선성을 확인하였다. 이에 대한 직선 방정식은  $y=13.197x-189.15$  의 식을 나타내었다.

**검출한계와 정량한계** - 검량선의 직선 방정식의 y 절편 값의 표준편차와 직선 방정식의 기울기를 이용하여 ICH 가이드라인에 따라 계산한 결과, ephedrine 의 검출한계는 36.8  $\mu\text{g/ml}$ , 정량한계는 110.4  $\mu\text{g/ml}$  을 나타내었다.

**주요성분의 함량분석** - HPLC 를 이용하여 8 개 마황의 주요 성분의 함량 분석을 위해 지표성분으로 선정한 ephedrine 의 표준액을 분석하였다. Ephedrine 은 5.3 분에서 확인하였다(Fig. 10-A, B, C). 마황 시료의 ephedrine 함량분석은 DNA 분석 결과와 비교하여 기원식물 간의 차이를 확인하였다(Fig. 10, Table 8). *E. intermedia* 로 판명된 EH1801 은 HPLC 분석을 통해 ephedrine 이 18.6  $\mu\text{g/ml}$  로 가장 낮게 확인되었고, 전체 성분 0.6%에 해당되었다(Fig. 10-A, D, Table 8). *E. sinica* 로 판명된 EH1802 는 24.4  $\mu\text{g/ml}$  의 ephedrine 이 확인되었고, 0.8%에 해당되었다(Fig. 10-D, Table 8). EH1802 와 동일한 종으로 판명된 탕포마황 EH1805 는 29.3  $\mu\text{g/ml}$  의 ephedrine 이 확인되었고, 1.0%에 해당되었다(Fig. 10-B, D, Table 8). 포를 한 마황 EH1805 는 포를 하지 않은 마황 EH1802 보다 높은 ephedrine 함량을 나타내어(Fig. 10-D), 마황은 포제 과정을 통해 ephedrine 함량이 늘었을 것으로 판단된다. 또한 *E. equisetina* 로 판명된 시료 중 중국산 EH1803, EH1804, EH1806 은 34.1~36.8  $\mu\text{g/ml}$  의 ephedrine 을 확인하였고, 1.1~1.2% 함량을 나타내었다(Fig. 10-C-1, D, Table 8). 파키스탄산 마황 EH1807 과 EH1808 은 각각 52.9  $\mu\text{g/ml}$  과

52.6 µg/ml 의 ephedrine 이 확인되었고, 두 가지 모두 1.8%의 함량을 나타내어 8 개 시료 중 가장 많은 ephedrine 을 함유한 것을 확인하였다(Fig. 10-C-2, D, Table 8).



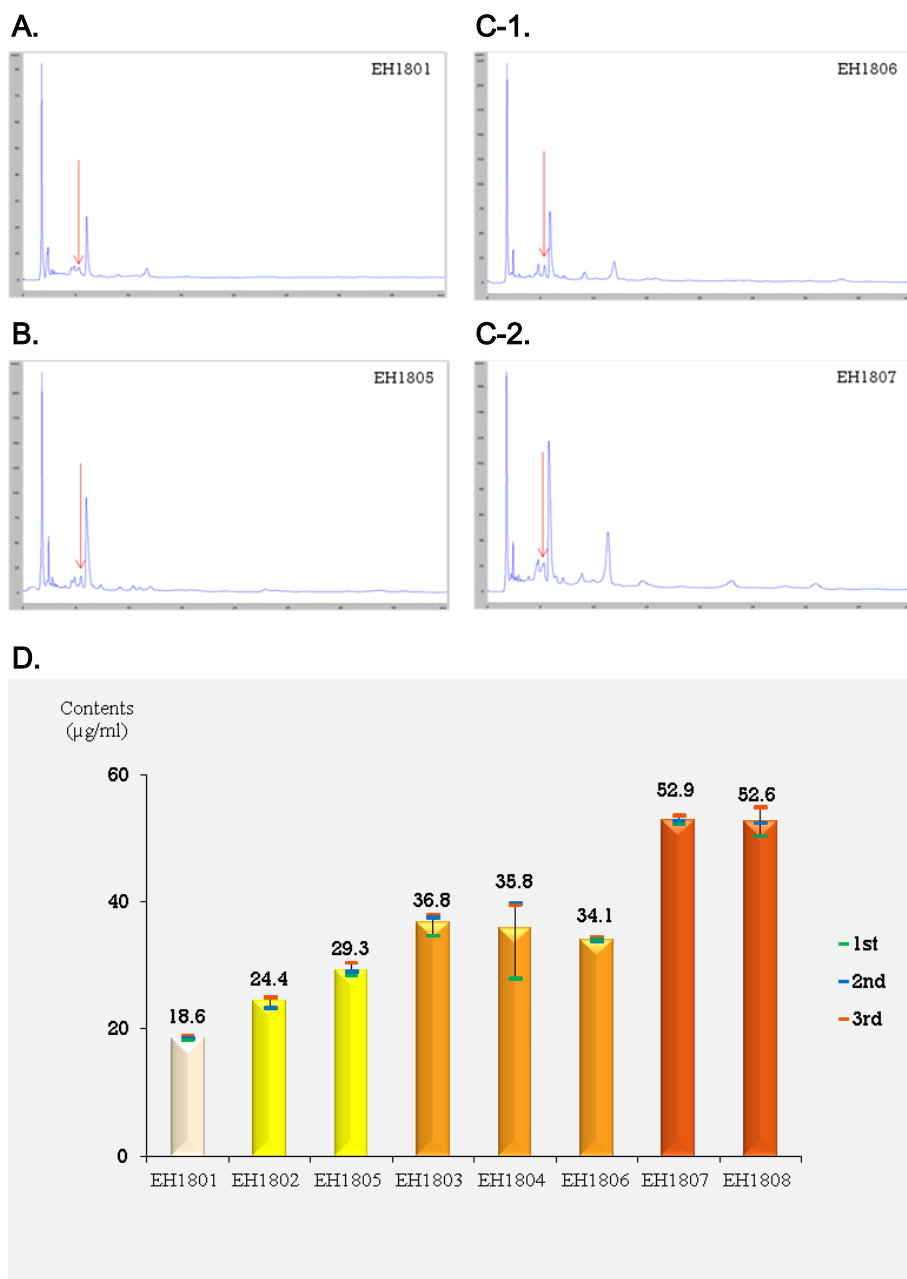


Fig. 10. Representative HPLC chromatograms of extract of Ephedrae Herba samples (A) EH1801; *Ephedra intermedia*, (B) EH1805; processed *E. sinica*, (C-1) E1806; *E. equisetina* from China, (C-2) 1807; *E. equisetina* from Pakistan, and the contents of ephedrine of the samples.

## 4. 고 찰

2019 년 국내 유통 중인 마황 8 개 시료를 수집하여 DNA 분석한 결과, 중국산 시료 6 개와 파키스탄산 시료 2 개는 모두 공정서 기준 적합한 기원 식물인 것으로 판명되었다. 중국산 시료는 *E. sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* 로 확인되었고, 파키스탄산 시료는 *E. equisetina* 로 판명되었다.

Ephedrine 지표물질을 이용한 HPLC 분석은 마황의 기원식물 세 가지 중 *E. equisetina* 가 ephedrine 함량이 가장 높았으며, 특히 파키스탄산 마황이 다른 중국산 종보다 최대 3 배까지 높은 것으로 나타났다. 이는 김병출 등(2014) 내용과도 일치한다. 김병출 등에 따르면 시중에 유통되는 식용 가능한 파키스탄산 마황은 *E. intermedia* Schrenk et C. A. Mayer 로 *E. intermedia* 중마황이 대부분이며, 중국 *E. sinica* 초마황에 비해 총 알칼로이드 함량이 2.5 배 많은 것으로 알려져 있다. 김병출 등은 파키스탄산 마황을 *E. intermedia* 로 제한 하였지만, 본 연구에서 진행한 파키스탄산 마황은 *E. equisetina* 이며, 이는 중국 *E. sinica* 초마황에 비해 ephedrine 함량이 약 2.5 배 많고, 중국 *E. intermedia* 중마황에 비해 3 배 많은 것으로 확인되었다.

본 연구 결과, 마황의 ephedrine 함량은 0.8~1.8%인 것으로 나타났다. 마황이 한의원에서 하루 2 첩약 8 g 이 처방된다면 통상적으로 우리는 하루에 64~144 mg 의 ephedrine 을 섭취하는 것으로 판단된다. 이는 미국 FDA 와 대한 한의사 협회의 ephedrine 의 일일 허용량을 기준 150 mg 으로 안전한 수치이지만, 한방에서는 마황 외에 여러 다른 한약재를 함께 배합하여 사용하는 경우도 많다. 마황을 단일약으로 쓰지 않고 다른 생약과 함께 사용했을 때 섭취되는 마황의 양은 각 처방약에 따라 달라진다. 서창섭 등(2016)의 ‘마황탕’

조성에 따르면 1 첩약 기준에서 마황은 11.25 g 이 사용된다.<sup>43)</sup> 마황탕을 하루 2 첩약 섭취했을 시 총 22.5 g 의 마황을 섭취하게 되는데, 이는 180~405 mg 의 ephedrine 을 섭취하는 것이고 일일 허용량 기준을 초과하는 양이다. 더욱이 ephedrine 함량이 가장 높은 파키스탄 마황은 최대 405 mg 의 ephedrine 을 포함하여 기준보다 2.7 배를 초과한다. 파키스탄 마황을 중국산과 구분 없이 같은 양으로 사용할 경우 더 큰 문제가 되므로 원산지 확인이 반드시 필요하다.

최근 마황이 일반인이 구매할 수 없는 생약으로 되었지만, 여전히 한의사나 전문인을 통하지 않고 개인 목적으로 마황을 대량 구매하는 경우가 있다. 마황의 지표성분이면서 감기 치료제로 사용되는 pseudoephedrine 이 마약류인 필로폰 제조에 사용되기 때문이다. 오랜 기간 전세계적으로 병증 치료와 체중 조절, 마약제조 등 다양한 목적을 가지고 사용된 마황은 채취부터 판매, 사용까지 모든 유통 과정에서 엄격하게 관리되어야 한다.

## V. 고찰

초오와 백부자, 마황의 국내시장 유통과정 시료를 수집하여 유전자 분석과 HPLC 분석을 한 결과 초오는 중국 신장지역의 식물인 *A.karakolicum* 이 무분별하게 수입되어 유통되고 있는 것으로 판단되어, 정확한 원산지 표기 과정에 엄격한 확인 절차가 필요한 것으로 사료된다. 백부자는 중국 약전에 수록된 독각련과 국내에서 위품으로 쓰이고 있는 뚱딴지와 혼란을 방지하기 위하여, 기원 식물 종을 정확히 동정함으로 국내 공정서 기준에 부합되는 식물이 사용되어야 한다. 수입되는 파키스탄산 마황은 trnK 구간의 염기서열을 분석하여 기원식물을 확인하였고, 국내 공정서 기준에 적합하다는 근거를 제시하였다. 그러나 일반적으로 한방 치료나 생약을 사용할 때 마황은 ephedrine 일일 허용량을 충분히 초과하며, 파키스탄산 마황이 더 많은 ephedrine 을 포함하고 있기 때문에 원산지에 따라 마황 사용량이 고려되어야 함을 제시하였다.

## VI. 참고문헌

1. 식품의약품안전청 (2017) 대한민국약전 (제 4 개정)
2. 식품의약품안전청 (2017) 대한민국약전외한약(생약)규격집 (제 11 개정)
3. Choi, G.Y., Ko, B.S., Jang, S., Chae, S.U., Lee, H.W. and Lee, M.Y. (2009) Quality Improvement through Monitoring of Imported Medicinal Herbs. *The Korea Journal of Herbology* 24: 63-67
4. Kim, B.C., Seok, H.J., Yoo, J.S., Ku, J.R., Yoon, K.H., Jo, J.H., Jang, D.H., Jung, Y.S., Kim, J.H., Ahn, Y.J., Woo, S., Yoon, M. and Shin, S.S. (2014) Comparison of Pakistani Ephedra Herba and Chinese Ephedra Herba Containing Gangjihwan in the Improvement Effects of Weight Loss in a High Fat Diet-Fed Obese Mice. *Herbal formula science* 22: 63-76
5. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회 (2006) 본초학, 313-314. 영림사, 서울
6. Milgrom, E. G., Sultankhodzhaev, M. N., Chang, C. H. (1996) Qualitative mass-spectrometric analysis of total diterpene alkaloids from roots of *Aconitum kusnezoffii*. *Chem. Nat. Compd.* 32: 71-73
7. 国家药典委员会 (2015) 中华人民共和国药典, 中国医药科技出版社., 北京
8. Kadota, Y. (1987) A revision of *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae) of East Asia, 142-153, Sanwa Shoyaku Company Ltd., Utsunomiya, Japan
9. Li, L. and Kadota, Y. (2001) *Aconitum* L. In Wu, Z., Raven, P.H. and Hong, D. (eds.), *Flora of China* Vol. 6, 149-222, Science Press, Beijing
10. Park, C.-W. (2007) *Aconitum* L. In *Flora of Korea* Editorial Committee (ed.), *The genera of vascular plants of Korea*, 176-182, Academic Publishing Co., Seoul

11. Oh, S. H. and Park, C. W. (1998) Crossability of the *Aconitum jaluense* species complex (Ranunculaceae) in Korea. *Kor. Biol. Sci.* 2: 435-438
12. Lim, C. E., Park, J. H. and Park, C.-W. (1999) Flavonoid variation of the *Aconitum jaluense* complex (Ranunculaceae) in Korea. *Plant Syst. Evol.* 218: 125-131
13. 曹晖, 邵鹏柱, 毕培曦 (2016) 中藥分子鉴定 技术与应用, 160-162, 人民卫生出版社, 北京
14. Usmanova, S. K., Sabir, G., Li, C., Hang, B., Aisa, H. A. and Shakirov, R. (2009) Components from *Aconitum karakolicum* roots. *Chem. Nat. Compd.* 45: 766-768
15. Rotblatt, M. and Ziment, I. (2002) *Evidence-based herbal medicine*, 19-40, Hanley and Belfus, Washington
16. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. and Taylor, J. L. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A. (eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 315-322, Academic Press, New York
17. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882
18. Ha, E. S., Kim, J. S., Baek, I. H., Yoo, J. W., Jung, Y., Moon, H. R. and Kim, M. S. (2015) Development of megestrol acetate solid dispersion nanoparticles for enhanced oral delivery by using a supercritical antisolvent process. *Drug Des. Devel. Ther.* 9: 4269
19. Li, J., Zhang, Y., Lin, Y., Wang, X., Fang, L., Geng, Y. and Zhang, Q. (2013) Preparative Separation and Purification of Bufadienolides from Chansu by

High-speed Counter-Current Chromatography Combined with Preparative HPLC.

*Quim. Nova* 36: 686-690

20. Korea Biodiversity Information System. <http://www.nature.go.kr/kbi/plant/pilbk/selectPlantPilbkGnrIList.do>
21. 생약학 교재 편찬위원회 (2013) 생약학, 268. 동명사, 경기
22. 전국한의과대학 공동교재 편찬위원회 (2006) 본초학, 491-492. 영림사, 서울
23. *Novenytt. Kozlem.* 6: 154, 1907
24. Zhang, Y., Wu, W., Kang, L., Yu, D. and Liu, C. (2017) Effect of *Aconitum coreanum* polysaccharide and its sulphated derivative on the migration of human breast cancer MDA-MB-435s cell. *International journal of biological macromolecules* 103:477-483
25. Jin, Y., Fan, J.T., Gu, X.L., Zhang, L.Y., Han, J., Du, S.H. and Zhang, A.X. (2017) Neuroprotective activity of cerebroside from *Typhonium giganteum* by regulating caspase-3 and Bax/Bcl-2 signaling pathways in PC12 cells. *Journal of natural products* 80: 1734-1741
26. Wang, X., Shu, X., Wang, X., Yu, J. and Jing, F. (2014) Preparative isolation of seven diterpenoid alkaloids from *Aconitum coreanum* by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Molecules* 19: 12619-12629
27. Zhang, L., Wang, A., Wang, X., Zhang, Y., Li, X. and Liu, P. (2014) Simultaneous determination of Guanfu base G and its active metabolites by UPLC – MS/MS in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B* 957: 1-6
28. 생약학 교재 편찬위원회 (2013) 생약학, 489-492. 동명사, 경기

29. 전국의한과대학 공동교재 편찬위원회 (2006) 본초학, 154-156,671-672. 영림사, 서울
30. White, L. M., Gardner, S. F., Gurley, B. J., Marx, M. A., Wang, P.-L., and Estes M. (1997) Pharmacokinetics and cardiovascular effects of ma-huang (*Ephedra sinica*) in normotensive adults. *Journal of Clinical Pharmacology* 37: 116-122
31. Shekelle P.G., Hardy M.L., Morton S.C., Maglione M., Mojica W.A., Suttorp M.J., Rhodes S.L., Jungvig L. and Gagné J. (2003) Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *JAMA* 289: 1537-1545
32. Vukovich M.D., Schoorman R., Heilman C., Jacob P 3<sup>rd</sup> and Benowitz N.L. (2005) Caffeine-herbal ephedra combination increases resting energy expenditure, heart rate and blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32: 47-53
33. Yamada, I., Goto, T., Takeuchi, S., Ohshima, S., Yoneyama, K., Shibuya, T., Kataoka, E., Segawa, D., Sato, W., Dohmen, T, Anezaki, Y., Ishii, H. and Ohnishi, H. (2007) Mao (*Ephedra sinica* Stapf) protects against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic failure. *Cytokine* 41: 293-301
34. Hashimoto, Y., Endo, M., Tominaga, K., Inuzuka, S. and Moriyasu, M. (1978) Quantitative analysis of phenethylamine derivatives by thin layer chromatography. Determination of psychotropic drugs and ephedra bases. *Microchimica Acta* 70:493-504
35. Carlini E. A. (2003) Plants and the central nervous system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75: 501-512



36. Minamizawa K., Goto H., Ohi Y., Shimada Y., Terasawa K. and Haji A. (2006) Effect of d-Pseudoephedrine on Cough Reflex and Its Mode of Action in Guinea Pigs. *J. Pharmacol. Sci.* 102: 136-142
37. U. S. Food and Drug Administration, FDA Web. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2004-02-11/html/04-2912.htm>, Dietary Supplements Guidance Documents & Regulatory Information, Final Rule: Declaring Dietary Supplements Containing Ephedrine Alkaloids Adulterated Because They Present an Unreasonable Risk. February 11, 2004
38. Song, M.Y., Kim, H.J. and Lee, M.J. (2006) The safety guidelines for use of Ma-huang in obesity treatment. *Journal of Korean Medicine for Obesity Research* 6: 17-27
39. Jang, I.S., Yang, C.S. and Hwang, E.H. (2007) The need for clinical practice guidelines in usage of Mahuang in weight loss. *Journal of Korean Medicine for Obesity Research* 7: 23-29
40. Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L. and Zhou, S. (2012) Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PloS one* 7: e35071
41. Kitani, Y., Zhu, S., Omote, T., Tanaka, K., Batkhuu, J., Sanchir, C., Fushimi, H., Mikage, M. and Komatsu, K. (2009) Molecular analysis and chemical evaluation of *Ephedra* plants in Mongolia. *Biological and pharmaceutical bulletin* 32: 1235-1243
42. Gul, R., Jan, S.U., Faridullah, S., Sherani, S. and Jahan, N., (2017) Preliminary phytochemical screening, quantitative analysis of alkaloids, and antioxidant

activity of crude plant extracts from *Ephedra intermedia* indigenous to Balochistan. *The Scientific World Journal* 2017: 1-7

43. Seo, C.-S. and Shin, H.-K. (2016) Quantitative Determination of Twelve Bioactive Components in Mahwang-tang, a Traditional herbal Prescription, using an LC-MS/MS. *Yakhak Hoeji* 60: 320-326

# Abstract

## Molecular Identification and Chemical Analyses of Korean Herbal Medicines

**Kyeonghwa Joe**

**Natural Products Science Major**

**College of Pharmacy**

**The Graduate School**

**Seoul National University**

The origins of oriental medicine (herbal medicine) used in the past have been defined in the Korean Pharmacopoeia, and many of them are defined as relative plants or many species. On the other hand, there are many cases where different plant species are defined between Korea and China. Especially, since the herbal medicine is often distributed in the form of a slice, it is difficult to confirm the origin of the herbal medicine by the appearance of it. Aconiti Kusnezoffii Tuber is officially defined as the tubers of *Aconitum kusnezoffii* Reichb., *A. ciliare* Decasisme, and *A. triphyllum* Nakai., but in Korea most of them are imported from China. Aconiti Koreani Tuber is defined as the root of *A. koreanum* Raymond, but in the domestic market, a large number of them are *Helianthus nuttallii*. Origins of Ephedrae Herba are defined *Ephedra Sinica*, *E. intermedia* or *E.*

*equisetina*, but they are all imported from China. However, with the recent diversification of imports, Ephedrae Herba is imported from Pakistan and other places.

In this study, we collected the samples of the current domestic market circulation of Aconiti Kusnezoffii Tuber and Aconiti Koreani Tuber, and analyzed the nucleotide sequence of nrRNA ITS 1 to identify the origin. Identification of the origins of Ephedrae Herba in the circulation was carried out by analysis of trnK sequence and the composition was compared using HPLC for chemical variation according to country of origin. Three of the 24 samples collected in the market were judged to be *Aconitum kusnezoffii* or *A. jaluense*(= *A. tryphyllum*), and 18 samples were identified as *A. karakolicum*, with the exception of three unrecoverable samples. Of the 16 samples from Aconiti Koreani Tuber, 3 were found to be *A. coreanum*, one plant species of *Aconitum*, and nine samples of *Helianthus nuttallii* of *Asteraceae*. The remaining 3 samples, which were not able to analyze the sequence of ITS 1, were analyzed by HPLC and contained chemical components of *Typhonium giganteum*. The nucleotide sequence of trnK showed that Ephedrae Herba of China contains *E. sinica*, *E. intermedia* and *E. equisetina* and the Pakistani sample was found to be *E. equisetina*. In the chemical analysis using HPLC, *E. equisetina* contained the largest amount of ephedrine among all three species and the content of ephedrine was 2~3 times higher than that of China. Thus, the identification of the originating plants through genetic analysis and the comparative analysis of the chemical components using the HPLC method are combined to give an example of the need to establish the quality standards of medicinal herbs distributed in the domestic market and the precise management standards of medicinal materials in the distribution process.

**Keywords:** Aconiti Kusnezoffii Tuber, Aconiti Koreani Tuber, Ephedrae Herba,  
DNA, Sequence, HPLC

**Student number:** 2017-26795